



Gustavo Oliveira Zoletti

**IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis* ATRAVÉS DAS
METODOLOGIAS PCR (*Polymerase Chain Reaction*) E
CONVENCIONAL EM CANAIS RADICULARES TRATADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Microbiologia, Instituto de Microbiologia
Professor Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Microbiologia)

Orientadores: Prof^a. Kátia Regina Netto dos Santos

Prof. José Freitas Siqueira Jr

RIO DE JANEIRO

Fevereiro / 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

ZOLETTI, Gustavo Oliveira.

Identificação de *Enterococcus faecalis* através das metodologias PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e convencional em canais radiculares tratados / Gustavo Oliveira Zoletti. Rio de Janeiro, UFRJ, IMPPG 2006.

ix, 97.; il.

Dissertação (Mestrado em - Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, 2006.

Orientadores: Kátia Regina Netto dos Santos
José Freitas Siqueira Jr

1. *Enterococcus faecalis*. 2. infecção endodôntica. 3. fatores de virulência.
4. tipagem molecular
 - I. Santos, Kátia Regina Netto dos (orientador)
Siqueira, José Freitas Jr (orientador)
 - II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes.
 - III. Identificação de *Enterococcus faecalis* através das metodologias PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e convencional em canais radiculares tratados

Dedico esta dissertação aos meus pais e minha irmã que sempre foram meus maiores e grandes amigos. O incentivo de vocês foi crucial para que minha carreira e principalmente minha vida seja maravilhosa. Dedico também a minha noiva Debora que sempre foi e será minha parceira de todos os momentos. Amo todos vocês.

Agradecimentos

À Prof^a. Kátia Regina Netto dos Santos pela intensa e carinhosa orientação. Sua forma de conduzir o aprendizado de seus alunos os torna pessoas muito melhores;

Ao Prof. Siqueira Jr por compartilhar seu incalculável conhecimento, permitindo a minha evolução profissional e científica. Obrigado por sua dedicação;

À Prof^a. Isabela Rôças pelo carinho e compreensão com que sempre esclareceu minhas dúvidas;

A equipe do Laboratório de Infecções Hospitalares: Carla, Eliezer, Fernanda, Fred, Jaqueline, Milena, Natália, Olinda, Ricardo, Roberta, Valéria. Agradeço pela cumplicidade e companheirismo na realização das diversas etapas de uma dissertação;

Aos queridos amigos do Departamento: Dalziza, Felipe, Hilana, Laís, Léo, Marcos, Naira. Vocês tornaram prazeroso o “aprendizado microbiológico”;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia Médica que contribuem e muito com o andamento de nossas dissertações e teses;

Aos Professores do Instituto de Microbiologia e em especial aos do Departamento de Microbiologia Médica pelas encantadoras informações passadas nas aulas e corredores do Departamento;

Aos queridos Professores dos Serviços de Endodontia das Faculdades de Odontologia da UFRJ e UNESA por permitir a coleta dos espécimes clínicos;

Ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, na pessoa de sua Diretora Prof^a. Ângela Hampshire;

À Prof^a. Thaís Souto-Padrón na coordenação da Pós-Graduação do nosso Instituto;

À Prof^a. Agnes Marie na coordenação do Departamento de Microbiologia Médica;

Às Instituições que contribuíram na execução desta dissertação: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT-PRONEX).

Se você pode achar um caminho sem obstáculos, provavelmente ele não leva a lugar nenhum”

Frank A. Clark

RESUMO

**IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis* ATRAVÉS DAS
METODOLOGIAS PCR (*Polymerase Chain Reaction*) E
CONVENCIONAL EM CANAIS RADICULARES TRATADOS***Gustavo Oliveira Zoletti*

Orientadores: Profa. Kátia Regina Netto dos Santos

Prof. José Freitas Siqueira Jr.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Enterococcus faecalis é o microrganismo mais encontrado em canais tratados e, devido a elevada incidência, seu papel vem sendo investigado na falha do tratamento endodôntico. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência deste microrganismo em canais tratados com e sem lesão perirradicular, verificar a relação clonal entre as amostras isoladas e detectar possíveis fatores de virulência. A identificação das amostras de *E. faecalis* foi realizada através de PCR e por método convencional. Foram investigados os fatores de virulência: gelatinase e proteína de superfície enterocócica através da detecção dos genes *gelE* e *esp*, por PCR enquanto que a gelatinase também foi caracterizada fenotipicamente. A relação clonal foi determinada por rep-PCR, utilizando o iniciador RW3A. A técnica de PCR foi significativamente mais sensível na detecção de *E. faecalis* (40/50 dentes; 80%) do que a cultura (8/50 dentes; 16%) ($p < 0.001$). Entre os 27 canais tratados sem lesão, *E. faecalis* foi detectado em 22 casos (81,5%) por PCR e em 5 casos (18,5%) por cultura, enquanto que entre os 23 canais com lesão, ele foi identificado em 18 casos (78,3%) por PCR e em 3 casos (13%) por cultura ($p > 0.05$). O gene *gelE* foi identificado em 31 casos (75,5%), correspondendo a 77,8% dos dentes com lesão (14/18) e 77,3% dos dentes sem lesão (17/22) ($p > 0.05$). Em todas as 8 amostras clínicas de *E. faecalis* isoladas em cultura foi detectado gene *gelE*, contudo em apenas 4 (50%) foi observada sua expressão fenotípica, enquanto que o gene *esp* foi detectado em apenas 3 (37,5%) amostras. A análise por rep-PCR demonstrou 5 grupos clonais distintos. Embora estes achados aparentemente não confirmem o papel do *E. faecalis* como uma possível espécie envolvida com a falha do tratamento endodôntico, a presença e a caracterização de seus fatores de virulência, bem como a diferença clonal encontrada no presente estudo, podem indicar um papel relevante de *E. faecalis* nas infecções refratárias.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, infecção endodôntica, fatores de virulência.

Rio de Janeiro
Fevereiro/2006

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *Enterococcus faecalis* IN ROOT CANAL TREATMENT ENDODONTIC BY USING PCR (Polymerase Chain Reaction) AND CULTURE PROCEDURES

Gustavo Oliveira Zoletti

Orientadores: Profa. Kátia Regina Netto dos Santos

Prof. José Freitas Siqueira Jr.

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Enterococcus faecalis is the microorganism most commonly found in endodontically treated root canals and, due to its high incidence, its pathogenic role has been studied in failed endodontic treatments. The purpose of this study is to evaluate the prevalence of this microorganism in treated root canals with and without periradicular lesion, verify the clonal relation between the isolated samples and detect possible virulence factors. The identification of the *E. faecalis* samples was performed by PCR and by conventional method. The virulence factors studied were: gelatinase and surface protein, through detection of *ge/E* and *esp* gene by PCR and phenotypic characterization of gelatinase. The analysis of the clonal relation was performed by rep-PCR, using the primer RW3A. The detection of *E. faecalis* was significantly more sensitive by PCR technique, 40/50 (80%), than by culture – 8/50 (16%) ($p < 0.001$). Among the 27 root canals without periradicular lesion, *E. faecalis* was detected in 22 cases (81.5%) by PCR and in 5 cases (18.5%) by culture, while among the 23 root canals with periradicular lesion, this microorganism was identified in 18 cases (78,3%) by PCR and in 3 cases (13%) by culture ($p > 0.05$). Out of 40 studied teeth, the *ge/E* gene was identified in 31 cases (75,5%), corresponding to 77,8% of the teeth with lesion (14/18) and 77,3% of the teeth without lesion (17/22) ($p > 0.05$). The *ge/E* gene was detected in all 8 clinical samples of *E. faecalis* isolated from culture, however only in 4 (50%) its phenotypic expression was observed. The *esp* gene was detected in only 3 (37,5%) of the samples isolated from culture. The rep-PCR demonstrated 5 distinct clonal groups. Although these findings apparently does not confirm the role of *E. faecalis* as a possible species involved in the failure of endodontic treatment, the presence and characterization of its virulence factors, as well as the different clones found in this study, indicate a important role of *E. faecalis* in refractory infections.

Key-words: *Enterococcus faecalis*, endodontic infection, virulence factores.

Rio de Janeiro

Fevereiro/2006

Índice

I. Introdução.....	01
I.1 Microbiologia das Doenças Pulpares e Perirradiculares.....	01
I.2 Infecção Persistente.....	06
I.3 Gênero <i>Enterococcus</i>	11
I.3.1 Fatores de Virulência.....	14
I.3.2 Epidemiologia Molecular.....	18
II. Objetivos.....	21
III. Material e Métodos.....	22
III.1 Seleção da amostra.....	22
III.2 Coleta e cultivo dos espécimes clínicos.....	24
III.3 Identificação convencional de amostras de <i>E. faecalis</i>	26
III.3.1 Caracterização do gênero <i>Enterococcus</i>	27
1- Coloração de Gram.....	27
2-Produção da enzima catalase.....	28
3- Hidrólise da esculina em presença de 40% de bile.....	28
4-Crescimento em 6,5% de cloreto de sódio.....	28
5-Hidrólise do PYR (L-Pirrolidonil- β -Naftilamida) (PYR) e do LAP (L-Leucina- β -Naftilamida).....	29
III.3.2 Identificação de espécies de enterococos.....	29
a- Produção da enzima arginina descarboxilase.....	31
b-Fermentação de carboidratos.....	31
c-Teste de motilidade.....	31
d- Produção de pigmento.....	32
III.4 Caracterização fenotípica da produção da gelatinase.....	32
III.5 Identificação genotípica da espécie e de fatores de virulência.....	32
1- Liberação do DNA por lise térmica segundo Siqueira & Rôças (2004)....	32
2- Identificação genotípica da espécie <i>E. faecalis</i>	33
3- Detecção de DNA bacteriano nos espécimes clínicos.....	34

4-Identificação de fatores de virulência.....	34
III.6 Análise do polimorfismo genético das cepas bacterianas.....	35
1- Liberação do DNA por lise térmica segundo Pacheco <i>et al.</i> (1997).....	35
2- Reação de PCR.....	36
3- Eletroforese de DNA.....	36
4- Análise dos Resultados.....	37
III.7 Amostras controle.....	37
III.8 Análise estatística.....	37
III.9 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	38
IV Resultados.....	39
IV.1 Eficácia da descontaminação da coroa dentária.....	39
IV.2 Detecção de <i>E. faecalis</i> através de PCR e cultura.....	39
IV.3 Detecção dos genes <i>gelE</i> e <i>esp</i> que codificam a gelatinase e a proteína de superfície enterocócica, respectivamente.....	42
IV.4 Caracterização fenotípica da gelatinase.....	43
IV.5 Análise do polimorfismo genético através de rep-PCR.....	43
V Discussão.....	58
VI Conclusão.....	71
VII Referências Bibliográficas.....	72
Anexo I	86
Anexo II	88
Anexo III	90
Anexo IV.....	92

I Introdução

I.1 Microbiologia das Doenças Pulpare e Perirradiculares.

A Endodontia possui como principais objetivos o tratamento e a prevenção de infecções que acometem o sistema de canais radiculares. As patologias pulpare e perirradiculares são de natureza inflamatória induzidas por fatores físicos, químicos e microbianos (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004). Contudo, o envolvimento microbiano vem sendo indicado como o principal fator associado a etiologia das doenças endodônticas (MILLER, 1894; KAKEHASHI, STANLEY & FITZGERALD, 1965; SUNDQVIST, 1976; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

Miller, em 1894, analisando espécimes de canais radiculares relatou a ocorrência das três formas básicas de células bacterianas conhecidas: cocos, bacilos e espirilos. Tal estudo é considerado o primeiro relato envolvendo a associação de microrganismos nas alterações pulpare e perirradiculares. No entanto, apenas cerca de 70 anos depois foi realmente estabelecido o papel essencial dos microrganismos na etiopatogenia das doenças endodônticas. No estudo realizado por Kakehashi, Stanley & Fitzgerald (1965), foi comparada a resposta de polpas dentais de ratos *germ-free* com aquelas de ratos convencionais após exposição ao meio bucal. Os animais convencionais, após determinado período de tempo, desenvolveram alterações inflamatórias irreversíveis ou necrose pulpar associada a lesões perirradiculares. Por sua vez, nas polpas dentais dos ratos *germ-free* foi observado reparo tecidual, com neoformação dentinária na área de exposição ao meio bucal.

Sundqvist, em 1976, investigou as condições bacteriológicas de canais radiculares de dentes humanos que apresentavam necrose pulpar após trauma dentário. Estes elementos dentários não apresentavam fratura coronária, cárie ou restaurações, condições que favorecem uma possível contaminação pulpar por patógenos orais. Dentre seus achados, destaca-se a prevalência de bactérias anaeróbias obrigatórias, as quais representaram mais de 90% das cepas isoladas. Microrganismos foram encontrados apenas em canais de dentes com lesão perirradicular associada, o que confirmou o papel essencial desempenhado pelo microrganismo na indução destas doenças. O autor ressaltou ainda a correlação entre o tamanho da lesão perirradicular e o número de espécies e de células bacterianas no canal radicular.

Mais recentemente, Siqueira & Rôças (2005a), analisaram, através de Nested-PCR, a prevalência de filotipos orais não cultiváveis e de novas espécies em infecções endodônticas primárias e persistentes. Em ambas infecções foi evidenciada a presença de doença perirradicular através de imagem radiográfica. Em seus resultados, observaram a presença de, pelo menos, um filotipo nas infecções primárias e a detecção de três novas espécies nas infecções persistentes. Concluíram que a detecção de bactérias não cultiváveis e de espécies recentemente nomeadas sugere que bactérias não conhecidas possam exercer um papel na patogenicidade da doença perirradicular.

Uma vez determinada a estreita relação entre microrganismos e as patologias que acometem a polpa dental e os tecidos perirradiculares foi possível a classificação das infecções radiculares. Tal classificação considera o momento

de estabelecimento microbiano no canal radicular: infecção primária, infecção secundária e infecção persistente (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004).

As infecções endodônticas primárias são mistas e determinados grupos de espécies microbianas estão mais relacionados a certos tipos de patologia perirradicular. A microbiota comumente identificada por cultura e por métodos moleculares em cada tipo de infecção endodôntica encontra-se apresentada na Tabela I.

Tabela I - Microrganismos mais freqüentemente detectados nos diferentes tipos de infecções endodônticas (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004).

Infecção primária	Infecção secundária e/ou persistente	Infecção extra-radicular
<i>Treponema</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Tannerella</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Streptococcus</i>	
<i>Porphyromonas</i>	<i>Candida</i>	
<i>Fusobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>	
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Eubacterium</i>		
<i>Actinomyces</i>		
<i>Campylobacter</i>		
<i>Propionibacterium</i>		
<i>Selenomonas</i>		
<i>Dialister</i>		
<i>Filifactor</i>		

Um dos requisitos para que um determinado microrganismo participe da patogênese das doenças perirradiculares é estar espacialmente localizado no sistema de canais radiculares. Tal sistema apresenta fatores nutricionais, tensão de oxigênio e interações microbianas que favorecem o crescimento de patógenos endodônticos. Além disso, a região permite que seus fatores de virulência, como proteinases e componentes bacterianos, sejam expressos e possam ter acesso aos tecidos perirradiculares resultando em uma resposta inflamatória (SIQUEIRA, 2002).

Recentemente, estudos utilizando métodos moleculares, como o da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), o *checkerboard* para hibridização DNA-DNA e o *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) permitiram reavaliar a prevalência e a composição da microbiota endodôntica. Muitas espécies bacterianas que anteriormente, através de testes convencionais de identificação, não eram isoladas destas infecções, foram detectadas. Como exemplos, temos: *Olsenella* ssp. (FOUAD *et al.*, 2002), *Tannerella forsythia* (CONRADS *et al.*, 1997; SIQUEIRA, RÔÇAS, SOUTO *et al.*, 2000; RÔÇAS *et al.*, 2001), *Treponema denticola* (SIQUEIRA, RÔÇAS, FAVIERI *et al.*, 2000), *Treponema maltophilum* (JUNG *et al.*, 2001) e *Prevotella tanneriae* (XIA, BAUMGARTNER & DAVID, 2000). Além disso, outras espécies, já detectadas pelo método convencional, foram detectadas em prevalência significativamente mais alta, por métodos moleculares (SIQUEIRA, RÔÇAS & SANTOS, 2001a; SIQUEIRA, RÔÇAS & SANTOS, 2001b; ROLPH *et al.*, 2001).

Quando microrganismos conseguem sobreviver à terapia endodôntica e quando durante ou após a mesma infectam o sistema de canais radiculares, estabelecem-se as infecções persistente e secundária, respectivamente (SIQUEIRA, 2002). Contudo tais infecções, classificadas como intra-radiculares, quando disseminadas para os tecidos perirradiculares dão origem à infecção extra-radicular. Seu estabelecimento pode resultar no fracasso da terapia endodôntica (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004).

As infecções secundária e/ou persistente são caracterizadas pela presença de microrganismos dos gêneros descritos na Tabela I, podendo ainda, apresentar bactérias não-orais, como: *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Acinetobacter* spp e pelas espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (HAAPASALO, RANTA & RANTA, 1983; RANTA, HAAPASALO & RANTA, 1988). Além destes, fungos também têm sido encontrados nestas infecções (PECIULINE *et al.*, 2001; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

As infecções persistentes são aquelas relacionadas ao fracasso do tratamento endodôntico. Apesar de alguns estudos terem sugerido que fatores não microbianos possam estar envolvidos com este fracasso (LIN *et al.*, 1991; SIQUEIRA, 2001), a persistência de uma infecção intra ou extra-radicular parece ser o fato mais relevante no desenvolvimento ou na perpetuação de uma patologia perirradicular pós-tratamento (SIQUEIRA, 2001; NOIRI *et al.*, 2002).

Os métodos convencionais de identificação microbiana, bem como os métodos moleculares, têm revelado que a microbiota relacionada às infecções intra-radiculares, secundária e/ou persistente associadas a canais radiculares

tratados, é significativamente diferente daquela relacionada às infecções primárias dos canais radiculares (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; HANCOCK *et al.*, 2001; FOUAD *et al.*, 2002). Enquanto as infecções primárias são compostas preferencialmente por bactérias anaeróbias obrigatórias, principalmente representadas por bacilos Gram-negativos (SUNDQVIST, 1992; GOMES *et al.*, 2004), as infecções secundária e/ou persistente são compostas por um menor número de espécies microbianas, havendo equivalência entre a prevalência de microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos (MOLANDER *et al.*, 1998; HANCOCK *et al.*, 2001; ADIB *et al.*, 2004). Os microrganismos mais associados ao fracasso endodôntico pertencem aos gêneros *Actinomyces* e *Enterococcus* (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998). Dentre as espécies do gênero *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* é a espécie mais freqüentemente associada ao fracasso da terapia endodôntica (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; HANCOCK *et al.*, 2001).

I. 2 Infecção Persistente

Diferentemente das características de uma infecção endodôntica primária, em casos de infecção endodôntica persistente, ocorre um predomínio de microrganismos Gram-positivos anaeróbios facultativos (HANCOCK *et al.*, 2001; ADIB *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2004), além do isolamento de um menor número de espécies (PINHEIRO *et al.*, 2003, SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

Visto que um menor número de espécies microbianas, ou mesmo uma monoinfecção pode ser encontrada em infecções persistentes, ressalta-se a capacidade de algumas espécies em resistir aos procedimentos de

descontaminação do sistema de canais radiculares, bem como às condições pós-tratamento, caracterizadas por um longo período de escassez nutricional (SIQUEIRA *et al.*, 1997; FIGDOR, DAVIES & SUNDQVIST 2003; RADCLIFFE *et al.*, 2004).

Love, em 2001, estudou o mecanismo pelo qual *E. faecalis* consegue sobreviver nos túbulos dentinários confinados pela obturação do canal, uma vez que sua invasão é realizada previamente ao tratamento endodôntico (SIQUEIRA, DE UZEDA & FONSECA, 1996). O estudo demonstrou que o microrganismo possui uma capacidade de manter o potencial de invasão nos túbulos dentinários mesmo com a diminuição dos nutrientes e sugere ainda, que o fluido tecidual proveniente das estruturas do periodonto possa fornecer nutrição suficiente para sua sobrevivência.

Além do fato da espécie *E. faecalis* conseguir sobreviver ao tratamento químico-mecânico realizado, a mesma possui ainda capacidade de resistir a elevados níveis de pH, em função de seu potencial de formação de biofilme e pelo funcionamento de uma bomba de prótons que reduz o pH citoplasmático (DISTEL *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2002). Em função desta capacidade, *E. faecalis* pode resistir ao tratamento com medicamentos intracanaais, como o hidróxido de cálcio (DAHLÉN *et al.*, 2000; ABDULLAB *et al.*, 2004). Sua capacidade de persistir em dentes tratados endodonticamente pode também demonstrar, mesmo que ainda não confirmada na endodontia, a influência dos fatores de virulência que as espécies do gênero *Enterococcus* apresentam.

Hubble e colaboradores, em 2003, analisaram os genes que codificam diversos fatores de virulência de *E. faecalis*, passíveis de expressão, relacionados com a adesão dentinária. Descreveram que a colagenase e a protease serina realizam um papel significativo na ligação da célula bacteriana à dentina radicular. Contudo, não foi possível descrever claramente um papel para a gelatinase.

Ainda, com relação aos fatores de virulência, Sedgley, Lennan & Clewel (2004) investigaram a prevalência e as características fenotípicas e genotípicas de *Enterococcus* isolados de amostras de saliva. Estas amostras foram coletadas de 100 pacientes, os quais apresentavam tratamento endodôntico, e de 100 estudantes de odontologia, que não possuíam dentes tratados endodonticamente. Isolaram 11 cepas de *E. faecalis* de pacientes que apresentavam tratamento endodôntico, das quais quatro produziam hemolisina, três gelatinase e cinco bacteriocina. Quanto às amostras de estudantes, apenas uma foi produtora de gelatinase e bacteriocina. O estudo apresentou como significativa a presença oral de *E. faecalis* em pacientes tratados endodonticamente.

Sundqvist e colaboradores (1998) verificaram que os fatores microbianos podem influenciar o prognóstico do tratamento endodôntico. Observaram que nos casos em que foi identificada a presença de *E. faecalis* no momento do retratamento, o prognóstico de sucesso, em torno de 66%, era menor do que nos casos sem esta espécie (73%).

Molander e colaboradores (1998) examinaram a microbiota existente em 100 canais obturados com lesão perirradicular, através de métodos convencionais de identificação. Encontraram crescimento bacteriano em 68% (68) dos

espécimes, dos quais, em cerca de 47% (32) dos casos, *E. faecalis* foi isolado. Apresentaram ainda o isolamento desta espécie em um dente sem a presença de lesão perirradicular. Neste caso, *E. faecalis* não foi a espécie dominante. Observaram também um declínio na obtenção de amostras bacterianas nos casos em que o material obturador dos canais foi removido com o auxílio de solvente (clorofórmio).

Dahlén e colaboradores (2000) estudaram através de testes de identificação, por método convencional (cultura), a prevalência de *E. faecalis* em infecções primárias e sua susceptibilidade aos antimicrobianos, bem como, a medicação intracanal. Observaram a presença desta espécie em 26 dos 29 dentes pesquisados e a resistência a um grande número de antimicrobianos.

Peciulienė e colaboradores (2001) avaliaram a ocorrência de microrganismos em canais previamente tratados com presença de lesão perirradicular, através de testes convencionais de identificação. Observaram a presença de *E. faecalis* em 21 (64%) dos 33 espécimes clínicos com cultura positiva. Em sete espécimes não houve crescimento microbiano. Relataram também o fato do tamanho da lesão perirradicular não refletir a quantidade e a espécie microrbiana envolvida na infecção.

Hancock e colaboradores (2001) investigaram a microbiota de infecções endodônticas refratárias através de métodos convencionais de identificação. Observaram a prevalência de *E. faecalis* em 30% (10) dos dentes com cultura positiva sendo que microrganismos foram cultivados em 33 dos 54 dentes examinados.

Pinheiro e colaboradores (2003) avaliaram as espécies mais comumente isoladas de canais previamente tratados e que apresentavam lesão perirradicular associada. Foram analisados 30 canais, dos quais 6 evidenciaram cultura negativa. Relataram ainda a presença de *E. faecalis* em 11 (46%) dos 24 canais com microrganismos cultivados. Observaram também um predomínio de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas.

A partir da utilização de métodos moleculares para identificação e detecção microbiana, foi possível observar uma maior incidência de *E. faecalis* nos casos de infecções primária e persistente (RÔÇAS, SIQUEIRA & SANTOS, 2004). Além disso, tais métodos permitiram estreitar a associação entre o fracasso do tratamento endodôntico e a presença de microrganismos, uma vez que estes foram detectados em todos os casos examinados (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). A Tabela II apresenta a prevalência de *E. faecalis* nos casos de infecção persistente em diferentes estudos realizados.

Tabela II – Prevalência de *E. faecalis* em casos de fracasso da terapia endodôntica (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004).

Estudo	Método de Identificação	Nº. de espécimes / presença microbiana	Detecção de <i>E. faecalis</i> (%)
Engström, 1964	Cultura	54 / 21	24% (5)
Möller, 1966	Cultura	54 / 31	29% (9)
Sundqvist <i>et al.</i> , 1998	Cultura	54 / 24	38% (9)
Molander <i>et al.</i> , 1998	Cultura	100 / 68	47% (32)
Peciulienė <i>et al.</i> , 2000	Cultura	25 / 20	70% (14)

Peciuliene <i>et al.</i> , 2001	Cultura	40 / 33	64% (21)
Hancock <i>et al.</i> , 2001	Cultura	54 / 33	30% (10)
Pinheiro <i>et al.</i> , 2003	Cultura	30 / 24	46% (11)
Siqueira & Rôças, 2004	PCR	22 / 22	77% (17)
Rôças <i>et al.</i> , 2004	PCR	30 / 30	67% (20)

Siqueira & Rôças (2004) investigaram através de PCR a ocorrência de várias espécies microbianas em casos refratários ao tratamento endodôntico. Observaram a presença de *E. faecalis* em 77% (17/22) dos casos, além da presença de pelo menos um microrganismo em todos os casos.

Rôças, Siqueira & Santos (2004), analisando a associação de *E. faecalis* com as diferentes formas de doenças perirradiculares através de PCR, encontraram esta espécie em 67% (20/30) dos casos refratários. Relataram também a associação deste microrganismo com casos assintomáticos, tanto em infecções persistentes, como em infecções primárias.

I.3 Gênero *Enterococcus*

Os enterococos são cocos Gram-positivos, catalase-negativos, cujas células podem distribuir-se em arranjos simples, aos pares ou em pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos e possuem um ótimo crescimento a uma temperatura de 35°C (crescimento pode variar de 10°C a 45°C). Tais espécies possuem ainda a capacidade de sobreviver ao aquecimento a 60°C por 30 minutos (HARTKE *et al.*, 1998). São microrganismos fastidiosos, com necessidades nutricionais variáveis e o crescimento requer meios complexos, contendo soro ou sangue. Todas as espécies do gênero crescem em caldo

contendo 6,5% de NaCl, em pH abaixo de 9,6, além de hidrolisarem a esculina na presença de 40% de sais biliares (FACKLAM & TEIXEIRA, 1998).

Os enterococos se apresentam como células de formato esférico, oval ou cocobacilar, as quais podem se arranjar em pares ou em pequenas cadeias. Colônias em ágar sangue possuem em média 1 a 2 mm de diâmetro, podendo ser menores (PORTENIER *et al.*, 2003). Aproximadamente, um terço das culturas de *E. faecalis* pode ser β -hemolítico em ágar contendo sangue de coelho, cavalo ou humano, porém não-hemolítico em ágar sangue de carneiro (FACKLAM & TEIXEIRA, 1998).

Os enterococos são microrganismos comensais que habitam os tratos gastrintestinal e vaginal, além da cavidade oral (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994). De acordo com o estudo do NNIS (*National Nosocomial Infections Surveillance System*, 1997) os enterococos são a quarta principal causa de infecções nosocomiais. Dentre as espécies, *E. faecalis* é a mais comum, representando de 80 a 90% das amostras de enterococos isoladas de humanos (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003). Sua importância clínica está associada ao fato de ser um patógeno oportunista, principalmente em pacientes com doenças severas, imunocomprometidos e que tenham permanecido hospitalizados por um longo período de tempo (ELSNER *et al.*, 2000). São, freqüentemente, isolados de infecções intra-abdominais, pélvicas e infecções de tecidos moles (PORTENIER *et al.*, 2003) e responsáveis por 5 a 15% dos relatos de infecções do trato urinário e de 8 a 15% dos casos de endocardites (SHANKAR *et al.*, 2001; NAKAYAMA, KARIYAMA & KUMON, 2002; BALDASSARRI *et al.*, 2004), tendo sido causadores

de 13,5% das bacteriemias entre 1992 e 1999 (NNIS, 1997). Estão presentes ainda na cavidade oral, bem como em infecções endodônticas primárias e infecções que acometem as estruturas periodontais (COLOMBO *et al.*, 1998; HUBBLE *et al.*, 2003; RÔÇAS, SIQUEIRA & SANTOS, 2004). Como dito anteriormente, predominam dentre as amostras isoladas de tratamentos endodônticos que fracassaram (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

Os enterococos foram fisiologicamente separados, em cinco grupos, de acordo com suas características fenotípicas de utilização do manitol, da sorbose e quanto à hidrólise da arginina. Os grupos e suas respectivas espécies estão listados na Tabela III (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003). Esta divisão classifica o *E. faecalis* no Grupo II, o grupo possui ainda: *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundii* e *E. gallinarum*. As cinco espécies apresentam como características fenotípicas comuns a formação de ácido em caldo manitol e a hidrólise da arginina, porém não formam ácido em caldo sorbose e possuem ainda variações quanto à utilização do sorbitol. *E. faecalis* é o único membro que não fermenta arabinose, mas tolera telurito e utiliza piruvato (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003).

Tabela III - Grupos de enterococos formados de acordo com características fenotípicas comuns (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003).

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. asini</i>	
<i>E. pallens</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. porcinus</i>	<i>E. cecorum</i>	
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. haemoperoxidus*</i>	<i>E. hirae</i>		
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. dispar</i>		
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. casseliflavus</i>			
<i>E. saccharolyticus</i>				

* espécie descrita recentemente, possivelmente será incluída do Grupo II

Durante várias décadas, a prevalência da espécie *E. faecalis* tem sido avaliada através da utilização do método de cultura, tanto em infecções endodônticas primárias (SUNDQVIST, JOHANSSON & SJÖGREN, 1989), quanto em infecções persistentes do sistema de canais radiculares (MOLANDER *et al.*, 1998, SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Estudos moleculares envolvendo detecção de enterococos a partir de infecções endodônticas, têm utilizado o *single* PCR para a amplificação do gene *tuf*, responsável pela codificação do fator de alongamento Tuf (FOUAD *et al.*, 2002), a amplificação da região intergênica do 16S/23S do rDNA (MOLANDER *et al.*, 2002), o método de *checkerboard* para hibridização DNA-DNA, utilizando sondas genômicas totais (SIQUEIRA, RÔÇAS & SANTOS, 2001a), a amplificação do 16S rDNA (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004) e o Real-Time PCR (SEDGLEY, NAGEL *et al.*, 2005).

I.3.1 Fatores de Virulência

As espécies do gênero *Enterococcus* não são intrinsecamente tão virulentos quanto outras espécies Gram-positivas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Streptococcus pyogenes*, o que torna o estudo de sua patogenicidade mais difícil (KOCH *et al.*, 2004). Apesar da não comprovação de uma possível participação dos fatores de virulência de enterococos em humanos, diversos destes fatores vêm sendo descritos (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994; MUNDY *et al.*, 2000; EATON & GASSON, 2001; PORTENIER,

WALTIMO & HAAPASALO, 2003). Estes têm sido bem caracterizados em *E. faecalis* e incluem: citolisinas e enzimas proteolíticas (gelatinase e protease serina), adesinas enterocócicas (substância de agregação, proteína de superfície enterocócica -Esp, proteína de adesão ao colágeno - Ace, antígeno A -EfaA) e polissacarídeos capsulares e da parede celular (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994; MORRISON, WOODFORD & COOKSON, 1997).

A gelatinase é uma metaloprotease fortemente hidrofóbica que pode clivar gelatina, insulina, caseína, hemoglobina, colágeno e fibrina (MÄKINEN, CLEWELL & MÄKINEN, 1989; WATERS *et al.*, 2003). Com a sua purificação em 1989 (MÄKINEN, CLEWELL & MÄKINEN, 1989) e posterior determinação de sua seqüência de nucleotídeos (SU *et al.*, 1991), inúmeros estudos foram descritos na tentativa de associar suas propriedades proteolíticas com a elevada incidência dos enterococos nas endocardites (BALDASSARRI *et al.*, 2004), bacteriemias (VERGIS *et al.*, 2002), infecções urinárias (NAKAYAMA, KARIYAMA & KUMON, 2002) e infecções orais (HUBBLE *et al.*, 2003). Apesar de contribuir para a virulência do *E. faecalis* em modelo animal (DUPONT *et al.*, 1998) e apresentar participação na formação de biofilme (HANCOCK & PEREGO 2004; KRISTICH, CVITKOVITCH & DUNNY, 2004), não foi possível comprovar ainda a ação da gelatinase em infecções humanas.

A proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp) é codificada pelo gene *esp* e está associada à parede celular, parecendo contribuir para a colonização e persistência de algumas cepas de *E. faecalis* durante infecções (SHANKAR *et al.*, 2001; KOCH *et al.*, 2004). Possivelmente, apresenta um papel determinante na

interação primária dos *Enterococcus* spp. à superfícies e na formação do biofilme através da interação entre as células bacterianas (SHANKAR *et al.*, 1999; MUNDY, SAHM & GILMORE, 2000; TENDOLKAR *et al.*, 2004).

Coque e colaboradores (1995) investigaram o papel dos fatores de virulência gelatinase, hemolisina e substância de agregação em amostras clínicas de *E. faecalis*. As amostras foram obtidas de pacientes com endocardite, com outros tipos de infecção, de pacientes hospitalizados sem infecção e de voluntários saudáveis da comunidade. A produção de gelatinase mostrou resultado significativo para amostras isoladas de casos clínicos, quando comparado às amostras isoladas de voluntários saudáveis. Contudo, tal fato não permitiu determinar sua participação na doença, uma vez que sua expressão esteve ausente em 46% dos casos de endocardite e presente em 62% das amostras hospitalares obtidas de indivíduos sem infecção.

Vergis e colaboradores (2002) avaliaram a associação entre a presença de fatores de virulência produzidos por enterococos, como gelatinase, hemolisina e proteína de superfície (Esp) na mortalidade de pacientes com bacteremia enterocócica. Foram pesquisados 398 pacientes sendo que em 219 amostras de enterococos isoladas, houve a produção da gelatinase em 64% e, em 32% foi observada a presença do gene *esp*. Contudo, tal percentagem não apresentou valor significativo quando relacionado a uma possível influência dos fatores de virulência na mortalidade do paciente.

Da mesma forma, Roberts e colaboradores (2004) observaram em 215 amostras fecais coletadas de pacientes com endocardites e voluntários saudáveis,

que a produção de gelatinase era similar entre os enterococos isolados dos diferentes grupos. Relataram também uma discrepância entre a produção de gelatinase (60%) e a presença do gene *geIE* (92%). Tal discrepância entre a presença do gene *geIE* e a expressão do fator de virulência pode ser justificada pelo fato da transcrição do gene ser regulada pelo locus *fsr* (QIN *et al.*, 2000; QIN *et al.*, 2001). O locus *fsr* composto pelos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* possui similaridade com o locus *agr/hld* presente em *Staphylococcus aureus* responsável pela regulação da expressão de fatores de virulência através de sistema *quorum-sensing* (QIN *et al.*, 2001).

Nakayama, Kariyama & Kumon (2002) definiram a relação entre fenótipo e genótipo na produção de gelatinase em amostras de *E. faecalis* isoladas de urina através da regulação pelo locus *fsr*. Os autores descreveram uma deleção cromossômica de 23,9 quilobases na região do locus *fsr* entre amostras que não expressavam a gelatinase, apesar de apresentarem o gene *geIE*. Relacionaram ainda que um feromônio está associado com a ativação da biossíntese da gelatinase pelo gene *geIE*. Este peptídeo media um sistema *quorum-sensing* em *E. faecalis* dependente da densidade celular para expressão do locus *fsr* e, conseqüentemente, o gene *geIE* (NAKAYAMA, CAO, HORII, SAKUDA & NAGASAWA, 2001; NAKAYAMA, CAO, HORII, SAKUDA, AKKERMANS *et al.*, 2001; CARNIOL & GILMORE, 2004). Em função da importância do locus *fsr* na expressão de fatores de virulência, sua identificação vem sendo considerada importante para determinar a patogenicidade do microrganismo (QIN *et al.*, 2000; PILLAI *et al.*, 2002; SIFRI *et al.*, 2002; ENGELBERT *et al.*, 2004).

Archimbaud e colaboradores (2002) investigaram a presença dos fatores de virulência Esp (proteína de superfície), AS (substância de agregação), citolisina e gelatinase em amostras de enterococos isoladas de pacientes com endocardites, bacteriemias e voluntários saudáveis. Avaliaram também a capacidade destas amostras aderirem a células humanas, *in vitro*. A produção de gelatinase foi demonstrada em 100% das amostras coletadas de sangue (pacientes com bacteriemia), em 55% dos voluntários e em apenas 20% dos pacientes com endocardite. Relataram que todas as amostras produtoras de gelatinase produziam também citolisina. Quanto à presença do gene *esp*, em todas as amostras de sangue e de endocardite foi identificado este gene. Contudo, não foi observada correlação da presença deste gene, bem como dos demais fatores de virulência, com a aderência bacteriana em células humanas *in vitro*.

Sedgley, Molander e colaboradores (2005) investigaram o fenótipo, e o genótipo e a virulência de 33 cepas de enterococos obtidas de canais radiculares. Entre as amostras, 31 eram de *E. faecalis*, das quais 23 (74,2%) produziam gelatinase e 18 (58,1%) apresentavam o gene *esp*. Contudo, todas as cepas de *E. faecalis* apresentavam o gene *gelE* que codifica a gelatinase. Para justificar esta diferença, os autores analisaram as oito amostras que não expressavam gelatinase e verificaram que seis apresentavam uma deleção cromossômica no locus *fsr*.

I.3.2 Epidemiologia Molecular

O aumento na taxa de isolamento de microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* no âmbito das infecções humanas, particularmente as de

origem nosocomial, gerou certo aprofundamento dos estudos referentes à diversidade genética daqueles microrganismos. O uso de técnicas moleculares tem contribuído de forma significativa na definição da distribuição clonal, tornando possível a demonstração da transmissão destes microrganismos por contato direto e indireto entre pacientes.

Os métodos de tipagem molecular, dependendo da metodologia empregada, apresentam diferentes graus de reprodutibilidade e de poder de discriminação. Vários desses métodos foram utilizados para a discriminação de amostras de *Enterococcus*, incluindo a análise do polimorfismo eletroforético de isoenzimas *MLEE - Multilocus Enzyme Electrophoresis* (TOMAYKO & MURRAY, 1995); análise de padrões plasmidiais (ZERVOS *et al.*, 1987); análise do DNA cromossômico após clivagem com endonucleases de elevada frequência de corte com posterior análise através de eletroforese convencional (REA) (HALL *et al.*, 1992); análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através das diferentes variantes da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (MURRAY, 1990); técnicas de amplificação do DNA baseados na metodologia da reação da polimerase em cadeia (PCR) com as suas diferentes variantes como a análise do polimorfismo de segmentos de DNA amplificados de forma aleatória (AP-PCR) (VAN BELKUM *et al.*, 1995) e a análise do polimorfismo das seqüências repetitivas palindrômicas extragênicas (rep-PCR) (MALATHUM *et al.*, 1998). Mais recentemente, somaram-se a essas, as técnicas de “Multilocus Sequence Typing”-MLST (NALLAPAREDDY *et al.*, 2002) e “Multiple-locus Variable-number Tandem Repeat Analysis”-MLVA (TOP *et al.*, 2004).

Quando comparada com outros métodos moleculares, a análise do DNA cromossômico, através da eletroforese em campo pulsado, mostrou-se com elevado poder discriminatório para correlacionar amostras, sendo a mais recomendada, até o momento, para estudos epidemiológicos (GORDILLO *et al.*, 1993; MALATHUM *et al.*, 1998).

O desenvolvimento de sistemas de tipagem genética contribuiu de forma marcante para o rastreamento e compreensão da disseminação de amostras de *Enterococcus*. Tais sistemas são baseados na observação de que, amostras de uma mesma espécie, podem apresentar ampla variabilidade no DNA, decorrente de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (TENOVER *et al.*, 1995; STRUELENS *et al.*, 1996). Diferentes sistemas de tipagem molecular são de auxílio em estudos epidemiológicos, sendo que a utilização combinada de vários deles parece ser o ideal (WILLEY *et al.*, 1994). Em contrapartida, os sistemas de tipagem fenotípica, tais como biotipagem, sorotipagem e fagotipagem são de valor limitado para o estudo de *Enterococcus*, devido ao baixo poder discriminatório, uma vez que não detectam diferenças significativas entre amostras da mesma espécie (MURRAY, 1990).

De acordo com o apresentado, em função da elevada incidência da espécie *E. faecalis* em casos de fracasso do tratamento endodôntico, torna-se necessário averiguar o papel deste patógeno no sistema de canais radiculares de dentes tratados com e sem lesão perirradicular, analisando sua incidência e verificando se alguns fatores de virulência estão associados com sua capacidade de persistência nestes canais.

II Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar possíveis fatores responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico através da análise da incidência de *E. faecalis* e seus fatores de virulência em dentes com canais tratados e indicação de retratamento.

Os objetivos específicos são:

- 1- Comparar a eficácia da técnica de PCR com a de cultura quanto à detecção e identificação de *E. faecalis* em dentes com canal radicular tratado;
- 2- Comparar a incidência de *E. faecalis* e a presença dos genes *geE* e *esp* em espécimes clínicos coletados de dentes tratados com e sem lesão perirradicular;
- 3- Correlacionar a presença do gene *geE* em amostras de *E. faecalis* isoladas com a capacidade de expressão do fator de virulência em meio de cultura.
- 4- Avaliar a diversidade genética das amostras de *E. faecalis* isoladas, através da análise do polimorfismo a partir da amplificação de padrões de seqüências repetidas (rep-PCR, *repetitive extragenic palindromic PCR*).

III Materiais e Métodos

III.1 Seleção da amostra.

Foram avaliados 53 dentes de aproximadamente 42 pacientes adultos com idades entre 19 e 76 anos com indicação de retratamento endodôntico, dos quais 25 apresentavam lesão perirradicular. Os casos sem lesão perirradicular foram encaminhados para retratamento quando: o dente apresentava persistência de sintomatologia dolorosa ou desconforto à percussão e à palpação, havia o contato do material obturador com a cavidade oral por um período maior que 30 dias (SIQUEIRA, RÔÇAS & LOPES, 2004). Ambos os grupos foram selecionados e separados através de exame radiográfico (Figura 1).

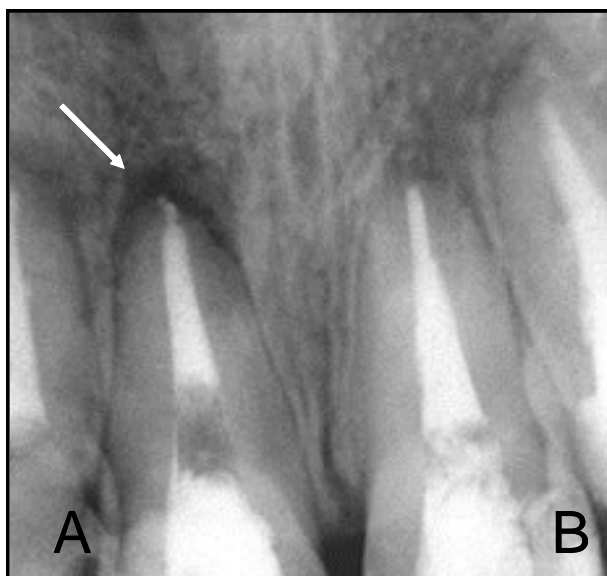


Figura 1 – A radiografia apresenta os dois tipos de casos selecionados no estudo. O dente A no qual é possível visualizar a presença da lesão perirradicular (indicada pela seta) e o dente B que não apresenta a patologia.

As amostras foram coletadas nos Serviços de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá. Alguns casos também foram coletados em um consultório particular situado na cidade do Rio de Janeiro.

Nas Instituições de ensino odontológico, o atendimento foi realizado por alunos sob supervisão de profissionais da própria instituição. Contudo, as etapas necessárias para a realização deste trabalho, incluindo a coleta de amostras clínicas, foram realizadas por um dos profissionais envolvidos no projeto. No serviço particular, todo o tratamento endodôntico foi realizado pelo próprio autor.

Além da indicação de retratamento do canal radicular, foram utilizados como critérios de inclusão os dentes nos quais o limite apical de obturação do sistema de canais radiculares encontrava-se entre 0 (zero) e cinco milímetros aquém do ápice radiográfico. Os dentes selecionados não apresentavam recessão gengival significativa, tampouco a presença de bolsa periodontal com profundidade maior que quatro milímetros.



Fig.2

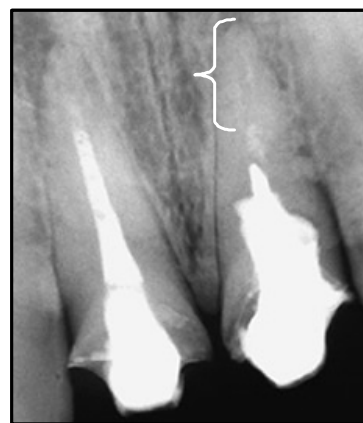


Fig. 3

Figuras 2 e 3 – Apresentam os critérios de exclusão utilizados no estudo. Na figura 2 a seta indica a presença de uma bolsa periodontal maior que 4 mm. Na figura 3 é possível a visualização de um limite apical de obturação maior que 5 mm do ápice radiográfico.

III.2 Coleta e cultivo dos espécimes clínicos

Os dentes incluídos no estudo foram submetidos à remoção de placa bacteriana, com a finalidade de diminuir possíveis contaminantes ao procedimento de coleta. Posteriormente, foram isolados do contato com a saliva na cavidade oral através da utilização de dique e lençol de borracha.

Após o adequado isolamento dos dentes da cavidade oral, o campo operatório foi descontaminado através da limpeza com peróxido de hidrogênio a 3% e posterior desinfecção com hipoclorito de sódio a 2,5% (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). Em seguida, procedeu-se o completo acesso à câmara pulpar e conseqüentemente ao material obturador presente no interior do canal. Tal procedimento foi realizado com brocas previamente esterilizadas sem a utilização de água. Logo após a adequada visualização do material obturador a ser removido, a câmara pulpar bem como todo o campo operatório, que inclui o lençol de borracha e o grampo para o isolamento, foram novamente desinfetados com o uso de hipoclorito de sódio a 2,5%.

Depois de eliminados os possíveis contaminantes no ato da coleta, resíduos de hipoclorito de sódio na coroa dentária e na câmara pulpar foram neutralizados com o uso de tiosulfato de sódio a 5% (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). Após a neutralização, foram coletadas amostras para o controle da eficácia da descontaminação, utilizando-se dois cones de papel esterilizados (EndoPoints – Paraíba da Sul, RJ, Brasil) esfregados sobre a superfície da coroa descontaminada. Os cones foram transferidos para tubos contendo 2 mL de caldo Enterococcosel (meio seletivo para microrganismos que conseguem hidrolisar

esculina na presença de bile; Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland - USA) e incubados a 35°C por um período de até 72 horas.

A guta-percha, material obturador endodôntico, foi removida da porção coronária do canal através da utilização de brocas Gates-Glidden (Dentsply – Petrópolis, RJ, Brasil), assim como o material localizado na porção apical através do uso de limas do tipo K (Dentsply) ou Hedström (Dentsply), ou ambas (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). Foi realizada uma radiografia para confirmação da completa remoção do material obturador e da desobstrução apical do dente. Não foram utilizados solventes, como eucaliptol e clorofórmio, para a remoção da guta-percha, em função da ação antimicrobiana destas soluções (MOLANDER *et al.*, 1998).

Após a confirmação radiográfica da remoção do material obturador, o canal radicular foi inundado com tiosulfato de sódio a 5%, em quantidade suficiente para preencher toda a luz do canal. Com o objetivo de proporcionar maior quantidade de material clínico para análise posterior, as paredes do canal foram limadas, com o uso de limas tipo-K (Dentsply). Este material constava de restos de material obturador, guta-percha e/ou cimento endodôntico, e “debris” de dentina radicular possivelmente contaminada. Para a coleta nesta etapa, foram utilizados quatro cones de papel absorvente esterilizados (EndoPoints), sendo que sua distribuição foi feita da seguinte forma: o primeiro e o quarto cones de papel colocados no interior do canal radicular foram transferidos para o meio Enterococcosel. Após a coleta o meio foi incubado a 35°C por um período de até

72 horas. O segundo e o terceiro cones de papel foram transferidos para uma solução de TSB-DMSO (dimetil sulfóxido em caldo de soja-tripticase - a partir da amplificação de padrões de seqüências repetidas (Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) a 5% (Sigma Chemical Co.) e imediatamente congelados. Os cones de papel permaneceram dentro do canal radicular até sua umidificação ser visualizada. Esta seqüência foi realizada em função da sensibilidade dos testes a serem empregados.

III.3 Identificação convencional de amostras de *E. faecalis*

As amostras positivas no caldo Enterococcosel foram inoculadas em placa contendo "Blood Agar Base" (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, seguida por incubação à 35°C por 18-24 horas. Uma vez confirmada a pureza das amostras, estas foram estocadas em criotubos contendo TSB (Sigma Chemical Co.) acrescido de 20% de glicerol (v/v) e armazenadas a uma temperatura de – 20°C.

Para identificação das amostras isoladas, uma alíquota de cada suspensão foi inoculada em placa contendo "Blood Agar Base" (Oxoid) acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, seguida por incubação à 35°C por 18-24 horas. Após a confirmação da pureza das amostras, foram realizados testes convencionais para a identificação do gênero *Enterococcus* e da espécie *E. faecalis* (FACKLAM & COLLINS, 1989; TEIXEIRA & FACKLAM, 2003).

As amostras foram inicialmente caracterizadas como *E. faecalis* através da morfologia colonial, aspecto morfotintorial, ausência na produção da enzima catalase, crescimento em presença de bile, crescimento em 6,5% de cloreto de

sódio, hidrólise de esculina, hidrólise do PYR e LAP, descarboxilação da arginina, teste de motilidade, produção de pigmento e produção de ácidos a partir da arabinose, manitol, metil α -D-glucopiranosídeo, rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose.

III.3.1 Caracterização do gênero *Enterococcus*

A Figura 4 mostra os testes usados para a caracterização do gênero *Enterococcus*.

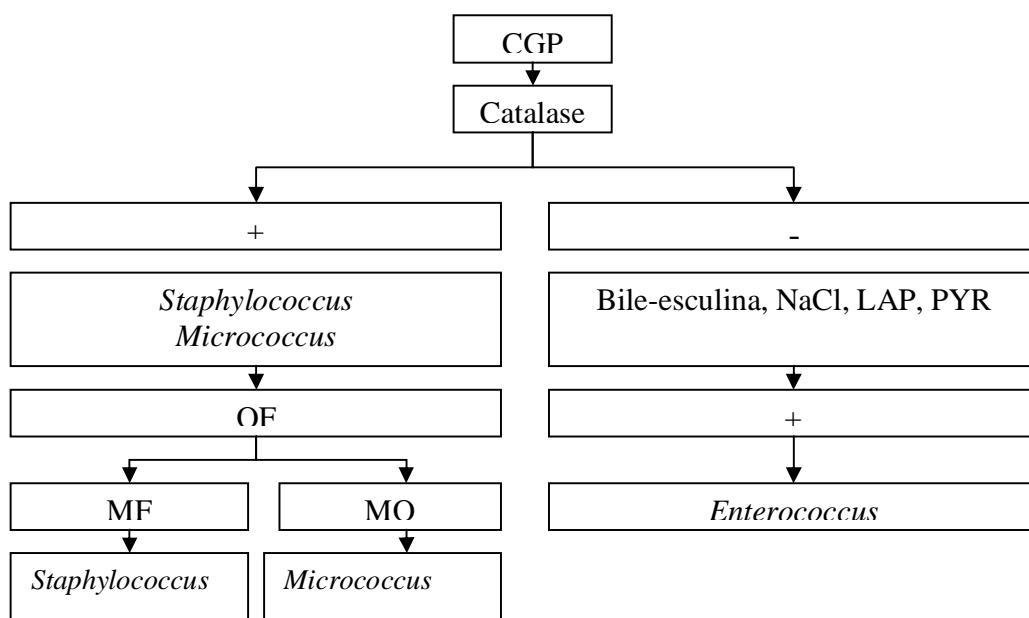


Figura 4 – Fluxograma para caracterização fenotípica do gênero *Enterococcus*

MF = Metabolismo Fermentativo

MO = Metabolismo Oxidativo

1- Coloração de Gram

Após o crescimento das amostras no caldo seletivo Enterococcosel (Becton Dickinson) a 35°C por 72 horas, estas foram cultivadas em ágar sangue.

Posteriormente, foi feito esfregaço em lâmina de vidro o qual foi corado pelo método de Gram e observado ao microscópio óptico.

2-Produção da enzima catalase

A observação da produção de catalase foi efetuada por metodologia convencional, em lâmina de vidro. Uma suspensão espessa do microrganismo foi depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (v/v). A formação de bolhas resultantes da hidrólise do H_2O_2 por ação da enzima catalase foi indicativa de reação positiva.

3- Hidrólise da esculina em presença de 40% de bile

As amostras foram semeadas em agar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, BEA, Difco Labs., Sparks, MD, USA) e incubadas a 35°C por 18h-24h. A positividade do teste foi considerada pelo escurecimento do meio, em função da hidrólise da esculina em esculetina, na presença de 40% (v/v) de bile. As amostras negativas foram confirmadas após sete dias de incubação.

4-Crescimento em 6,5% de cloreto de sódio

A tolerância a altas concentrações de sal foi observada pelo crescimento bacteriano em 3 mL de *BHI - Brain Heart Infusion* (Difco Labs.) acrescido de cloreto de sódio a 6,5% (p/v) (Merck Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil), 0,1% de solução alcoólica de púrpura de bromocresol (Sigma Chemical Co.) a 1,6% (v/v) e 0,1% (p/v) de D-glicose (Sigma Chemical Co.). Após incubação a 35°C durante 18-24h a turvação do meio acompanhada ou não da mudança de coloração de púrpura para amarelo foi considerada como indicativo de reação positiva.

5-Hidrólise do PYR (L-Pirrolidoni- β -Naftilamida) (PYR) e do LAP

(L-Leucina- β -Naftilamida)

Para a execução destes testes, uma suspensão espessa de cada amostra obtida a partir do crescimento em ágar sangue a 35°C por 18h-24h foi preparada em 0,2mL de caldo Todd-Hewitt (*Todd-Hewitt Broth*, THB, Difco, Labs.) contendo 0,01% (p/v) de PYR (Sigma Chemical Co.) ou 0,02% (p/v) de LAP (Sigma Chemical Co.). Após um período de 4h de incubação a 37°C em banho-maria, foram adicionadas uma a duas gotas de solução reveladora contendo dimetilamino cinamaldeído a 1% (Sigma Chemical Co.) em HCl (Merck) a 10% (v/v). A leitura do teste foi feita imediatamente após agitação suave e em até 10 minutos. A positividade dos testes foi considerada pelo aparecimento de coloração rosa forte ou púrpura.

III.3.2 Identificação de espécies de enterococos (FACKLAM & COLLINS, 1989; TEIXEIRA e FACKLAM, 2003)

A Tabela IV mostra as características bioquímicas das principais espécies do gênero citado.

Tabela IV - Características bioquímicas das principais espécies de enterococos (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003).

ESPÉCIES	M A N	S O R	A R G	A R A	S B L	R A F	M O T	P I G	S A C	M G P
Grupo I										
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Grupo II										
<i>E. faecalis</i>	+ *	-	+ *	-	+	-	-	-	+ *	-
<i>E. faecium</i>	+ *	-	+	+	V	V	-	-	+ *	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+ *	+	V	+	+ *	+ *	+	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+ *	+	-	+	+ *	-	+	+
Grupo III										
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>E. díspar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>E. porcinus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV										
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Grupo V										
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-

MAN – manitol; SOR – sorbose; ARG – descarboxilação da arginina; ARA – arabinose; SBL – sorbitol; RAF – rafinose; TEL – telurito; MOT – motilidade; PIG – produção de pigmento; SAC – sacarose; MGP - metil α -

D-glucopiranosídeo. Símbolos: + 90% ou mais de cepas positivas; - 10% ou menos de cepas positivas; V 11-89% de cepas positivas; * ocorrência de amostras atípicas.

a- Produção da enzima arginina descarboxilase

Para o teste da decarboxilação da arginina foi utilizado o meio *Decarboxylase Base Moeller* (Difco, Labs.) com pH 6,0 e acrescido de 1% (p/v) de L(+)-arginina (Sigma Chemical Co.). Após a inoculação de uma gota da suspensão densa da amostra preparada em salina 0,85%, foi adicionada uma camada de cerca de 10 mm (3 a 4 gotas) de óleo mineral estéril (Nujol, Ind. Quim. e Farmac. Schering Plough S.A, Rio de Janeiro, Brasil) e os testes foram incubados a 35°C. Um tubo com caldo *Base Moller* sem arginina também foi inoculado com a amostra como controle do teste. A leitura do teste foi feita diariamente após 24, 48 e 72 horas de incubação. A modificação da coloração do meio para amarelo foi indicativo de resultado negativo.

b-Fermentação de carboidratos

A fermentação de carboidratos foi verificada pela inoculação de duas gotas de suspensão densa da amostra em salina a 0,85%, em 3mL de caldo *HIB* contendo 0,1% (p/v) de púrpura de bromocresol e 1% (p/v) (Sigma Chemical Co.) de um dos seguintes açúcares: manitol, sorbose, arabinose, sorbitol, rafinose, sacarose e metil α -D-glucopiranosídeo (Sigma Chemical Co.). A leitura foi feita diariamente por um período de até sete dias de incubação a 35°C. A modificação de coloração do meio para amarelo foi indicativa de resultado positivo.

c-Teste de motilidade

A motilidade foi verificada pela inoculação da amostra a partir de meio sólido, em picada vertical com auxílio de uma agulha bacteriológica em 3mL do meio semi-sólido "Motility Medium" (Gibson Laboratories, Inc. Lexington, KY,

EUA). A leitura foi feita diariamente por um período de até sete dias de incubação a 30°C.

d- Produção de pigmento

A produção de pigmento foi verificada após cultivo da amostra na superfície de placas contendo ágar sangue em 18-24 horas de incubação a 35°C, através da utilização de um “swab” passado sobre o crescimento bacteriano. A produção de pigmento é indicada pela visualização de uma coloração amarela.

III.4 Caracterização fenotípica da produção da gelatinase (COQUE *et al.*, 1995)

A produção da gelatinase foi determinada utilizando-se o meio *Todd-Hewitt*, acrescido de 1,5% (p/v) de ágar e 3% (p/v) de gelatina (Sigma Chemical Co.). Após crescimento das amostras em Agar sangue estas foram cultivadas em *spots* na superfície do meio com gelatina, as placas foram incubadas por 18-24 horas a 35°C e então resfriadas por 5 horas a 4°C. O aparecimento de um halo opaco ao redor da colônia correspondeu a um resultado positivo de hidrólise da gelatina.

III.5 Identificação genotípica da espécie e de fatores de virulência

1- Liberação do DNA por lise térmica segundo Siqueira & Rôças (2004)

Todos os espécimes clínicos estocados em TSB-DMSO (Sigma Chemical Co.) foram descongelados e agitados em vortex por 30 segundos. A suspensão foi lavada três vezes com 100 µl de água Milli-Q esterilizada e centrifugada por 2 minutos a 2500 x g. O sedimento foi recuperado em 100 µl de água Milli-Q, fervido por 10 minutos e imediatamente resfriado em gelo por 1 hora.

Posteriormente, após centrifugação por 10 segundos a 9000 x g a 4°C para remoção de debris celulares, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a reação de PCR.

2- Identificação genotípica da espécie *E. faecalis* (RÔÇAS, SIQUEIRA e SANTOS, 2004)

Para a identificação desta espécie bacteriana foram utilizados 5µl do DNA liberado por lise térmica em um volume final de reação de 50µl, além de 1pM de cada iniciador específico, 5 µl de tampão PCR 10X (10mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 25mM de KCl – Biotools B&M Labs. S.A., Nave, Madrid, Espanha), 2 mM de MgCl₂, 1.25 U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e 100µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (Life Technologies).

Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 36 ciclos de amplificação foram realizados através de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 2 minutos.

DNA alvo	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho amplicon (pb)	Referência
rDNA 16S de <i>E. faecalis</i>	5`-GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG-3` 5`-CCG TCA GGG GAC GTT CAG-3`	310	Rôças, Siqueira & Santos, 2004

3-Detecção de DNA bacteriano nos espécimes clínicos (ASHIMOTO *et al.*, 1996)

Para a confirmação da presença de DNA bacteriano nos espécimes clínicos e da eficácia da extração de DNA, foi utilizado o protocolo segundo Ashimoto *et al.* (1996) com iniciadores universais para o gene DNAr 16S. O volume da reação final de PCR, seus componentes bem como os ciclos de amplificação foram semelhantes ao protocolo descrito para a identificação do *E. faecalis*.

DNA alvo	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho amplicon (pb)	Referência
DNAr 16S	5`-GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC AC-3`	602	Ashimoto <i>et al.</i> , 1996
Universal	5`-CCC GGG AAC GTA TTC ACC G-3`		

4-Identificação de fatores de virulência (EATON & GASSON, 2001)

As reações de PCR para detecção de fatores de virulência foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo 5µL de tampão PCR 10X (10mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 25mM de KCl - Biotools), 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (Life Technologies), 20pmol de cada iniciador, 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies), e 5µL da solução de DNA molde.

Para a detecção dos genes *gelE* (gelatinase) e *esp* (proteína de superfície) as misturas de reação foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação de 94°C, por 2 minutos, anelamento de 52°C, por 2 minutos e extensão de 72°C, por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 92°C, por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

DNA alvo	Seqüência dos <i>primers</i>	Tamanho amplicon (pb)	Referência
<i>ge/E</i>	5'-ACCCCGTATCATTGGTTT-3' 5'-ACGCATTGCTTTTCCATC-3'	419	Eaton & Gasson, 2001
<i>esp</i>	5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACCC-3' 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	933	Eaton & Gasson, 2001

Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador do tipo PTC-100 (*Programable Thermal Controller*, MJ Research Inc., Watertown MA, EUA). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 80V em tampão TBE 1X (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). O gel foi corado posteriormente com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL; Sigma Chemical Co.) e fotografado sob luz ultravioleta. Como padrão de DNA para a corrida eletroforética, foi utilizado 100pb ladder (Life Technologies).

III.6 Análise do polimorfismo genético das cepas bacterianas

A análise do polimorfismo genético gerado a partir da amplificação de padrões de seqüências repetidas (rep-PCR, *Repetitive Extragenic palindromic PCR*) foi realizada seguindo as recomendações descritas por Kang & Dunne (2003).

1- Liberação do DNA por lise térmica segundo Pacheco *et al.* (1997)

A extração do DNA bacteriano foi realizada com base na metodologia proposta por Pacheco e colaboradores (1997) com algumas modificações. Após o cultivo inicial em "Blood Agar Base" (Oxoid) acrescido de 5% de sangue

desfibrinado de carneiro, as amostras foram incubação à 35°C por 18-24 horas. Em seguida 5 a 10 colônias foram suspensas em 3mL de caldo “Trypticase soy broth” (Sigma Chemical Co.) e incubadas a 35°C sob agitação por 18-24h. Uma vez determinado os volumes das alíquotas de cada amostra, correspondentes a uma D.O.₆₀₀ de 0,4, estes foram, então, centrifugados a 3.000g por 7 minutos e as células suspensas em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA pH 8,0). A suspensão bacteriana foi, então, submetida à fervura por 10 minutos, centrifugada e o sobrenadante utilizado como fonte de DNA nas reações de amplificação.

2- Reação de PCR

Nesta etapa, 5,0 µL da preparação de DNA foi adicionada à mistura da reação de PCR, contendo 75 pmol do iniciador RW3A -5`CCGCAGCCAA-3` (NAMDARI & DELVECCHIO, 1998), 2,5 µl de tampão PCR 10X (10mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 25mM de KCl), 3 µl de MgCl₂ (50mM); 2,0 µl de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (50µM) (Life Technologies), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) e água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL. Esta mistura foi submetida uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minuto e uma extensão final por 5 minutos a 72°C em termociclador (PTC-100 *Programable Thermal Controler*, MJ Research Inc.).

3- Eletroforese de DNA

Os produtos de amplificação foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Gibco-BRL) durante 1 hora e 30 minutos, em corrente

constante de 100 V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi o TBE 1X (0,89 M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5 mM EDTA, pH 8,2). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL; Sigma Co.), visualizado em transiluminador de UV e imediatamente fotografado.

4- Análise dos Resultados

Amostras apresentando perfis idênticos foram consideradas como do mesmo clone (SANTOS *et al.*, 2001).

III. 7 Amostras controle

As amostras de *E. faecalis* OG1RF (*geI*⁺) e controle positivo da expressão fenotípica da gelatinase); *E. faecium* Ec2594 (*esp*⁺); *E. faecium* Ec2594 (controle negativo do PCR espécie-específico); *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo no teste da catalase) foram utilizadas como controle nos testes bioquímicos bem como nos testes moleculares de identificação microbiana, de fatores de virulência e de análise do polimorfismo genético.

III.8 Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o teste do Qui-quadrado com correção de Yates' para a análise da associação entre *E. faecalis* e a doença perirradicular, através de sua identificação por PCR e cultura, bem como da associação com os genes *geI* e *esp* que codificam fatores de virulência enterocócicos. A comparação da eficácia dos métodos de PCR e cultura na detecção de *E. faecalis* em espécimes clínicos também foi realizada. Os resultados obtidos por PCR foram utilizados também para avaliar a associação entre *E. faecalis* e sexo, tempo de

tratamento e limite apical de obturação. Foi estabelecida significância em valores de 5% ($p < 0.05$).

III.9 Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Esta pesquisa, bem como a ficha clínica do paciente (anexo I) e o termo de consentimento livre esclarecido (anexo II) foram analisados e aprovados pelo CEP do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF/UFRJ (anexo III) sob o número 140/04.

IV RESULTADOS

IV.1 Eficácia da descontaminação da coroa dentária

Dos 53 dentes selecionados para o estudo, três casos com lesão perirradicular e positividade no meio Enterococcosel para *Enterococcus* foram excluídos do estudo. Tal exclusão ocorreu uma vez que não seria possível determinar a correta origem do microrganismo identificado, já que a coroa dentinária se apresentava contaminada concomitantemente ao canal. Sendo assim, o número de dentes incluídos no estudo foi de 50 dos quais 23 apresentavam lesão perirradicular e 27 não apresentavam esta lesão.

IV.2 Detecção de *E. faecalis* através de PCR e cultura

No presente estudo, *E. faecalis* foi detectado através de cultura e PCR. Entre os casos analisados 33 foram detectados apenas por PCR, sete através de cultura e PCR, e uma amostra apenas foi identificada por cultura, totalizando 41 casos clínicos. Os resultados mostraram que, dos 50 dentes selecionados, em 16 casos foi observada positividade no cultivo primário (Tabela V). Contudo, dentre estes casos, apenas oito (16%) amostras foram identificadas como *E. faecalis*. É possível observar ainda na tabela V que, através de PCR o *E. faecalis* foi detectado em 40 (80%) dentes.

Os resultados também foram analisados quanto a associação entre a presença de *E. faecalis* e outras condições clínicas ou demográficas. *E. faecalis* foi detectado em 23 (79%) dos 29 espécimes clínicos coletados de pacientes do sexo feminino e em 17 (81%) dos 21 referentes ao sexo masculino, não

apresentando diferença significativa ($p = 0.83$). Com relação ao tempo pós-tratamento endodôntico, este fator não interferiu na prevalência do microrganismo, visto que *E. faecalis* foi detectado em 17 (77%) dos 22 casos de tratamentos com menos de cinco anos e em 23 (82%) dos 28 casos nos quais o tratamento havia sido realizado a mais de cinco anos ($p = 0.94$). Outro aspecto clínico analisado foi o limite apical de obturação. Este aspecto também não influenciou na prevalência de *E. faecalis*. Entre os 39 dentes com o limite de obturação entre 0 e 2 milímetros, o microrganismo foi identificado em 32 (82%), enquanto entre os 11 dentes obturados dois milímetros aquém do ápice radiográfico *E. faecalis* foi detectado em oito (73%) ($p = 0.79$). Os resultados referentes aos outros aspectos clínicos apresentados estão descritos na Tabela V.

Os percentuais de *E. faecalis* através de cultura e PCR e a associação destes valores com lesão perirradicular estão apresentados na tabela VI. Foi possível observar que dos 50 dentes selecionados 40 (80%) apresentavam *E. faecalis* quando analisados por PCR, enquanto que apenas 8 (16%) amostras foram detectadas através do cultivo. A diferença entre a detecção de *E. faecalis* por PCR e cultura foi estatisticamente significativa ($p < 0.001$), confirmando a maior sensibilidade do método molecular. Na análise de dentes com e sem lesão, dos 50 casos incluídos no estudo, 27 não apresentavam lesão perirradicular e, neste caso a análise por PCR mostrou maior percentual de identificação, com 22 (81,5%) casos frente aos 5 (18,5%) detectados por cultura. Nos casos com lesão perirradicular (23 dentes), 18 (78,3%) e 3 (13%) casos foram positivos para *E. faecalis*, por PCR e cultura, respectivamente. Independente do método de

identificação, a frequência de *E. faecalis* em casos com lesão perirradicular não foi significativamente diferente daquela observada em casos sem lesão ($p > 0.05$). (Tabela VI).

Nas tabelas VII e VIII estão descritos os testes bioquímicos utilizados na identificação das amostras clínicas isoladas a partir do cultivo primário em meio Enterococcosel. A identificação preliminar através de seis testes bioquímicos classificou, inicialmente, as amostras no gênero *Enterococcus*. Das 16 amostras que apresentaram positividade no caldo Enterococcosel apenas 8 (amostras clínicas 4, 12, 18, 29, 35, 37, 44 e 45) expressaram fenotipicamente as características referentes ao gênero (Tabela VII). Posteriormente, estas amostras foram identificadas como *E. faecalis* através da utilização de 10 testes fenotípicos, conforme observado na tabela VIII. Entre as 8 amostras identificadas, 7 apresentaram perfis fenotípicos semelhantes, enquanto uma mostrou positividade na fermentação do MGP (metil α -D-glucopiranosídeo), característica fenotípica atípica para a espécie *E. faecalis*. Para a ratificação da identificação bioquímica, todas as amostras identificadas como *E. faecalis* foram posteriormente analisadas através de PCR com a utilização de pares de iniciadores específicos para a espécie. O método de PCR confirmou a identificação das 8 amostras como *E. faecalis*, incluindo a amostra atípica detectada (Figura 5).

Foi observada a presença de bactéria em 100% dos espécimes clínicos analisados. Tal resultado foi possível uma vez que os espécimes clínicos negativos na detecção de *E. faecalis*, por PCR, tiveram seus materiais reanalisados, através de iniciadores universais (PCR), com o objetivo de identificar

a presença microbiana no canal dentário tratado. A positividade em todos os casos analisados demonstrou a eficácia da técnica de extração de DNA e a ausência de inibidores significantes da reação de PCR (Figura 6).

IV. 3 Detecção dos genes *geE* e *esp* que codificam a gelatinase e a proteína de superfície enterocócica, respectivamente

A tabela IX apresenta a frequência de detecção do gene *geE* através de PCR diretamente dos espécimes clínicos. Foi possível observar que dos 40 espécimes clínicos positivos para *E. faecalis*, por PCR, em 31 (77,5%) foi visualizada a amplificação do gene *geE* (Figura 7). Ao analisarmos separadamente dentes, com e sem lesão, verificamos que dos 18 dentes com lesão, 14 (77,8%) apresentavam o gene *geE*, enquanto que entre os 22 sem lesão o gene foi observado em 17 (77,3%). Não foi observada diferença significativa entre a presença do gene *geE* e a presença ou não de lesão perirradicular nos canais tratados ($p = 0.73$). Observou-se também que o gene foi detectado em todas as amostras isoladas em cultura ($n = 8$) (Tabela X). Com exceção de uma amostra que não foi detectada através de PCR direto do espécime clínico (amostra 4), todos os casos positivos para o gene nestes espécimes clínicos foram positivos também em amostras cultivadas correspondentes.

Outro fator de virulência, possivelmente correlacionado com a persistência bacteriana nas infecções endodônticas, é a proteína de superfície enterocócica (*Esp*). De acordo com a tabela X, foi possível observar que das oito amostras de *E. faecalis* analisadas, em três (37,5%) foi detectado o gene *esp* pela

visualização através de eletroforese em gel de agarose de uma banda com 933 pb (Figura 8). Não foi possível a detecção do gene *esp* diretamente nos espécimes clínicos, mesmo naqueles em que houve a detecção nas amostras de *E. faecalis* correspondentes.

IV. 4 Caracterização fenotípica da gelatinase

Em relação à caracterização fenotípica da gelatinase, houve uma discrepância entre a presença do gene e sua expressão pela bactéria, isto é, apesar de todas as amostras possuírem o gene que codifica o fator de virulência gelatinase, apenas quatro (50%) delas (Tabela X) apresentaram halo opaco referente a positividade do teste fenotípico da gelatinase (Figura 9).

IV.5 Análise do polimorfismo genético através de rep-PCR

A análise do polimorfismo bacteriano através de rep-PCR utilizando-se o iniciador RW3A foi inicialmente realizada em amostras controle com características geneticamente distintas: *E. faecalis* DS16 (*cyIM*⁺ *cyIB*⁺ *cyIA*⁺ *agg*⁺); *E. faecalis* V583 (genótipo *vanB*) e *E. faecalis* OG1RF (*geE* +) (colunas 02, 03 e 04, respectivamente; figura 10). O perfil de bandas visualizado no gel de agarose para as respectivas amostras apresentou de 5 a 9 bandas, demonstrando a diversidade clonal entre as amostras de *E. faecalis* utilizadas no experimento. O resultado obtido pela amplificação de seqüências dispersas repetitivas no DNA das amostras de *E. faecalis* isoladas de canal radicular tratado permitiu a distribuição das 8 amostras em 5 grupos clonais distintos (Figura 10). No genótipo A, foram alocadas as amostras 35 e 37 (colunas 09 e 10, respectivamente; figura

10). Neste grupo, as duas amostras estavam relacionadas a dentes com lesão perirradicular e foram gelatinase positivas. As amostras do genótipo A apresentaram perfil genotípico semelhante a da amostra *E. faecalis* OG1RF, controle positivo para o gene *gelE* e expressão positiva da gelatinase. No genótipo B, foi incluída apenas a amostra 12 (coluna 06 na figura 10), relacionada a dente com lesão. No genótipo C foram alocadas as amostras 04 e 45 (colunas 05 e 12, respectivamente; figura 10). Neste grupo, as amostras não estavam relacionadas a dentes com lesão perirradicular. No genótipo D, foram incluídas as amostras 18 e 29 (colunas 07 e 08, respectivamente; figura 10), de cujos dentes não apresentavam lesão perirradicular, porém as amostras também produziram gelatinase. No genótipo E foi incluída a amostra 44 (dente sem lesão) (coluna 11; figura 10). As amostras distribuídas no mesmo grupo apresentaram similaridade no perfil de bandas amplificadas, sendo consideradas como de outro grupo ou clone à visualização de pelo menos uma banda diferente.

Tabela V – Características relacionadas aos 50 casos de canais dentários tratados analisados no presente estudo

No Espécimes clínicos	Sexo	Idade	Dente	Período de Tratamento (anos)	Limite apical (mm)	Lesão	Tamanho da Lesão (mm)	Testes (dor)			Restauração			Crescimento em Enterococcosel	PCR <i>E. faecalis</i> do espécime clínico
								SD	P	Pa	Def	Prv	A		
01	M	44	44	4	1	N	-					X		-	+
02	F	32	21	10	2	S	1				X			-	-
03	M	22	45	2	1	S	2						X	-	+
04	F	43	11	5	1	N	-				X			+ ^(a)	-
05	F	46	24	5	3	N	-				X			-	+
07	F	43	12	5	0,5	S	12				X			+ ^(b)	+
08	M	38	12	10	1	S	11		X	X	X			-	+
09	F	57	22	2	1	S	10		X		X			-	+
11	F	40	25	10	0	N	-						X	-	+
12	F	28	25	5	1	S	1	X	X	X			X	+ ^(a)	+
13	M	45	11	5	2	N	-				X			-	+
14	F	41	35	>1	2	S	10					X		+ ^(b)	+
15	F	54	41	10	1	S	2			X		X		-	+
16	M	62	15	15	1	S	1				X			+ ^(b)	-
17	M	45	21	> 5	0	N	-				X			-	+
18	M	45	22	> 5	4	N	-				X			+ ^(a)	+
19	M	45	12	> 5	0	S	1				X			-	+
20	M	52	45	6	3	S	1				X			-	+
21	F	19	25	3	4	N	-						X	+ ^(b)	-
22	M	75	41	2	0	S	6					X		-	-
23	M	62	44	12	4	N	-				X			+ ^(b)	+
24	F	46	14	8	2	N	-				X			-	+
25	F	36	22	11	1	S	1				X			-	+
26	M	49	14	2	1	N	-						X	-	+
27	F	46	23	5	2	N	-				X			-	+
28	F	30	14	2	2	S	1	X	X		X			+ ^(b)	+
29	M	26	15	2	1	N	-						X	+ ^(a)	+
31	F	59	22	4	1	S	3				X			-	+
32	F	28	21	2	2	N	-				X			-	-

Tabela V – Características relacionadas aos 50 casos de canais dentários tratados analisados no presente estudo (Continuação)

No Espécimes clínicos	Sexo	Idade	Dente	Período de Tratamento (anos)	Limite apical (mm)	Lesão	Tamanho da Lesão (mm)	Testes (dor)			Restauração			Crescimento em Enterococcosel	PCR <i>E. faecalis</i> do espécime clínico
								SD	P	Pa	Def	Prv	A		
33	M	26	25	> 2	0	N	-						X	-	+
34	F	33	15	2	1	N	-						X	-	+
35	M	38	12	6	0	S	2				X			+(a)	+
36	F	37	34	5	1	S	1				X			+(b)	+
37	M	38	22	4	3	S	5					X		+(a)	+
38	M	51	25	> 20	4	N	-		X		X			-	-
39	F	36	32	2	2	N	-				X			-	+
40	F	36	41	2	0	S	2	X			X			+(b)	-
41	F	37	11	> 10	5	N	-					X		-	+
42	F	39	12	20	2	S	1				X			-	-
43	M	36	11	> 1	4	N	-					X		-	+
44	F	39	11	> 6	0	N	-				X			+(a)	+
45	F	45	25	> 5	1	N	-						X	+(a)	+
46	F	39	12	3	0	S	2					X		-	+
47	M	50	11	25	3	N	-				X			-	+
48	F	30	15	2	1	N	-	X	X		X			-	+
49	F	30	24	2	0	S	4				X			-	+
50	F	29	12	> 5	2	N	-	X				X		-	+
51	M	26	21	> 1	5	N	-				X			-	-
52	F	30	21	3	0,5	S	1				X			-	+
53	M	25	22	> 5	1	N	-				X			-	+

M = masculino; F = feminino; S = sim; N = não; SD = sintomatologia dolorosa; P = percussão positiva; Pa = palpação positiva; Def = definitiva; Prv=provisória; A = ausente; ^(a) Amostra positiva para *E. faecalis*, através de PCR e cultura; ^(b) Amostra negativa para *E. faecalis*, através de PCR e cultura.

Tabela VI – Percentual de amostras de *Enterococcus faecalis* detectadas através de cultura e PCR, e associação com lesão perirradicular

Lesão perirradicular (Nº. de dentes)	Nº. (%) de amostras e espécimes positivos	
	Cultura ^(a)	PCR ^(b)
Sim (23)	3 (13%)	18 (78,3%)
Não (27)	5 (18,5%)	22 (81,5%)
Nº. (%) total de espécimes (50) ^(c)	8 (16%)	40 (80%)

^(a) valor não significativo $p = 0.89$ - associação entre lesão perirradicular e detecção de *E. faecalis* por cultura;

^(b) valor não significativo $p = 0.94$ - associação entre lesão perirradicular e detecção de *E. faecalis* por PCR;

^(c) valor significativo $p < 0.001$ – o método de PCR foi mais sensível do que a cultura na detecção de *E. faecalis*.

Tabela VII – Identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* a partir de amostras que cresceram no cultivo primário em caldo Enterococcosel

Nº. da amostra clínica	Provas Bioquímicas						Identificação positiva para o gênero <i>Enterococcus</i>
	Coloração de Gram	Teste da Catalase	Crescimento em bile e hidrólise da esculina	LAP	PYR	Crescimento em 6,5% de NaCl	
04	CGP	-	+	+	+	+	+
07	CGP	-	+	-	-	+	-
12	CGP	-	+	+	+	+	+
14	CGP	+	NR	NR	NR	NR	-
16	BGP	NR	NR	NR	NR	NR	-
18	CGP	-	+	+	+	+	+
21	CGP	-	+	-	-	-	-
23	CGP	-	+	-	-	+	-
28	CGP	+	NR	NR	NR	NR	-
29	CGP	-	+	+	+	+	+
35	CGP	-	+	+	+	+	+
36	CGP	-	+	-	-	-	-
37	CGP	-	+	+	+	+	+
40	CGP	-	+	-	-	+	-
44	CGP	-	+	+	+	+	+
45	CGP	-	+	+	+	+	+

P

PYR (L-Pirrolidonil- β -Naftilamida); LAP (L-Leucina- β -Naftilamida); CGP – coco Gram-positivo; BGP – bacilo Gram-positivo; NR – não realizado.

Tabela VIII – Identificação fenotípica da espécie *Enterococcus faecalis* a partir de espécimes clínicos isolados de canais dentários tratados

Nº. da amostra	Provas bioquímicas									
	ARG	ARA	MAN	MGP	RAF	SAC	SOR	SBL	MOT	PIG
04	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
12	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
18	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
29	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
35	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
37	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
44	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
45	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-

ARG – descarboxilação da arginina; ARA – arabinose; MAN – manitol; MGP - metil α -D-glucopiranosídeo; RAF – rafinose; SAC – sacarose; SOR – sorbose; SBL – sorbitol; MOT – motilidade; PIG – produção de pigmento.

Tabela IX – Frequência de detecção do gene *geE* em espécimes clínicos positivos para *Enterococcus faecalis*, e associação com patologia perirradicular

Lesão perirradicular (nº. de casos positivos para <i>E. faecalis</i>)	No. (%) de espécimes clínicos positivos para o gene <i>geE</i>
Sim (18)	14 (77,8%)
Não (22)	17 (77,3%)
Nº. (%) total de casos (n = 40)	31 (77,5%)

(p = 0.73)

Tabela X – Características observadas nas oito amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas em cultura, em relação a patologia perirradicular e aos fatores de virulência gelatinase e proteína de superfície enterocócica

Nº. da amostra de <i>E. faecalis</i>	Presença de lesão perirradicular	Presença dos genes		Teste da gelatinase
		<i>esp</i>	<i>gelE</i>	
04	Não	-	+	-
12	Sim	+	+	-
18	Não	-	+	+
29	Não	+	+	+
35	Sim	-	+	+
37	Sim	-	+	+
44	Não	+	+	-
45	Não	-	+	-

(+) - resultado positivo; (-) – resultado negativo

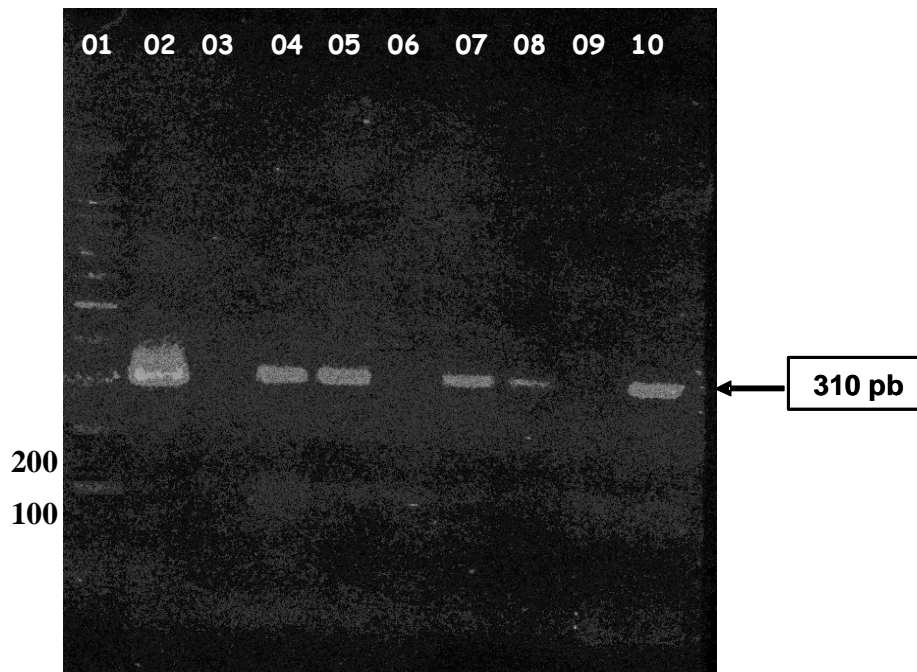


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 310 pb do DNAr 16S de *E. faecalis* em espécimes clínicos endodônticos submetidos a PCR: Linha 1 – padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linha 2: controle positivo – amostra padrão (*E. faecalis* OG1RF); Linha 3 – controle negativo (*E. faecium* Ec2594); Linhas 4, 5, 7, 8 e 10 – amostras clínicas identificadas como *E. faecalis* (n^{os} 4, 18, 29, 37 e 44 respectivamente); Linhas 6 e 9 – amostras clínicas negativas (n^{os} 7 e 14 respectivamente).

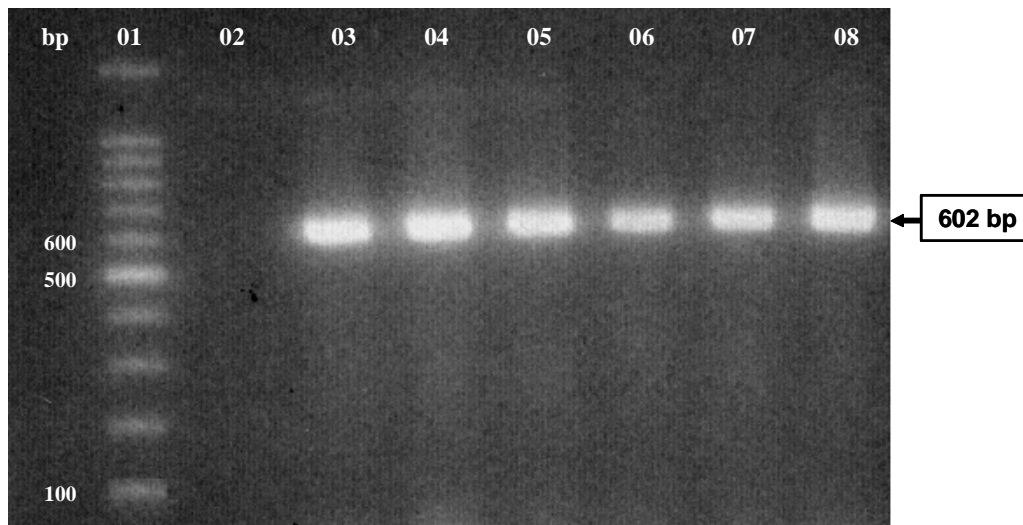


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose evidenciando a presença de um segmento de 602 pb do DNAr 16S universal amplificado a partir de espécimes clínicos endodônticos: Linha 1 - padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linha 2 – controle negativo do PCR; Linha 3: controle positivo do PCR (*E. faecalis* OG1RF); Linhas 4 a 8 – espécimes clínicos coletados de canais de dentes com e sem lesão perirradicular (n^{os} 2, 16, 21, 22 e 32).

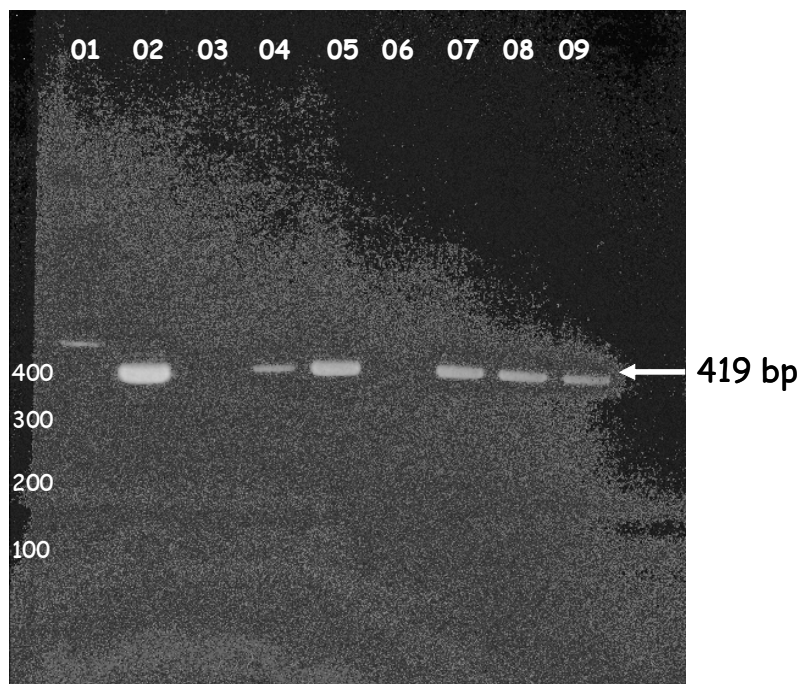


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 419 pb do gene *geE* que codifica a expressão do fator de virulência gelatinase em *Enterococcus faecalis*: Linha 1 - padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linha 2: controle positivo (*E. faecalis* OG1RF); Linha 3 –controle negativo do PCR; Linhas 4, 5, 7, 8 e 9 – espécimes clínicos positivos para *E. faecalis*, positivos também para a detecção do gene *geE* (n^{os} 1, 3, 5, 7 e 8 respectivamente); Linha 6 – espécime clínico positivo para *E. faecalis*, negativo para a detecção do gene *geE* (n^o 15).

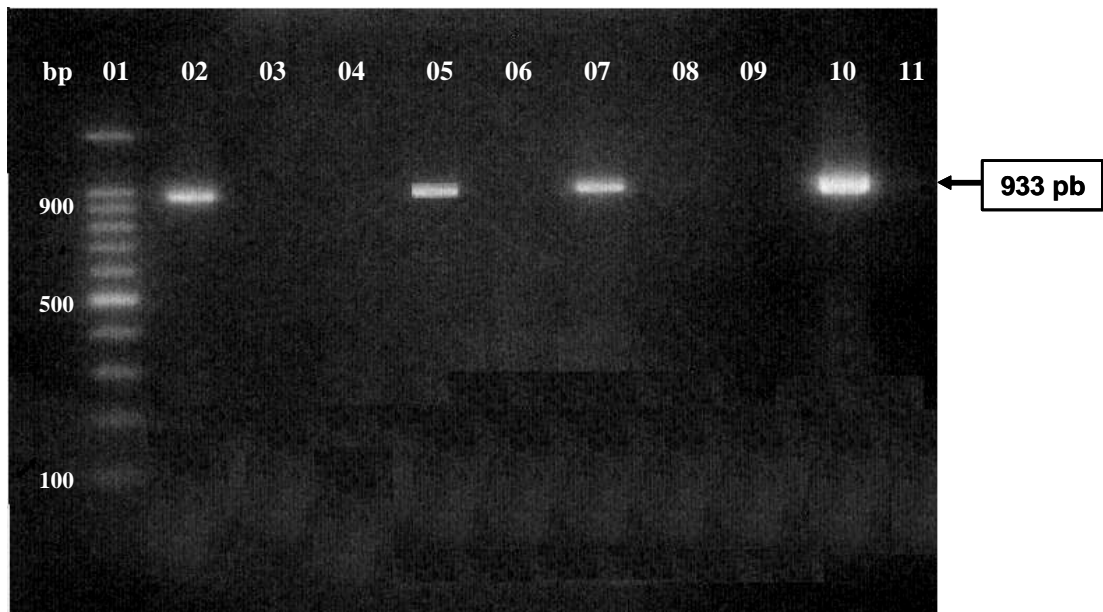


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose evidenciando um segmento de 933 pb referente ao gene *esp* que codifica a expressão da proteína de superfície enterocócica em *Enterococcus faecalis*: Linha 1 - padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linha 2 – controle positivo; Linha 3 – controle negativo do PCR; Linhas 5, 7 e 10 – amostras de *E. faecalis* positivas para o gene *esp* (n^{os} 12, 29 e 44 respectivamente); Linhas 4, 6, 8, 9 e 11 – amostras de *E. faecalis* negativas para o gene *esp* (n^{os} 4, 18, 35, 37 e 45 respectivamente).



Figura 9 – Caracterização fenotípica da produção de gelatinase por amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de canais radiculares tratados. Amostras clínicas negativas 4, 12, 44 e 45. Amostras clínicas positivas 18, 29, 35 e 37. Amostra *E. faecalis* OG1RF – controle positivo.

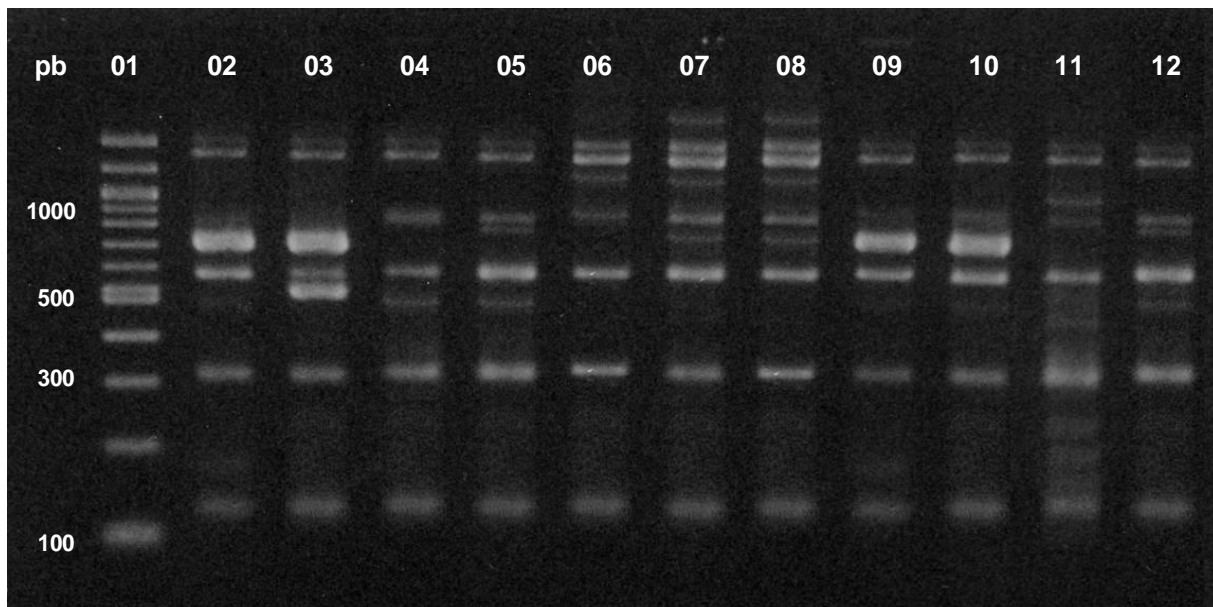


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose do perfil de fragmentos gerados por rep-PCR das amostras controle e de amostras clínicas de *Enterococcus faecalis* isoladas de canais tratados. Linha 1: padrão de tamanho de DNA em pares de bases (100pb ladder); Linhas 2, 3 e 4 controle: *E. faecalis* DS16 (*cyIM*⁺ *cyIB*⁺ *cylA*⁺ *agg*⁺); *E. faecalis* V583 (genótipo *vanB*) e *E. faecalis* OG1RF (*geIE*+) respectivamente; Linhas 5 e 12: amostras clínicas 4 e 45 (Genótipo C); Linha 6: amostra clínica 12 (Genótipo B); Linhas 7 e 8: amostras clínicas 18 e 29 (Genótipo D); Linhas 9 e 10: amostras clínicas 35 e 37 (Genótipo A); Linha 11: amostra clínica 44 (Genótipo E).

V Discussão

Grande parte dos estudos realizados em relação à microbiota endodôntica têm utilizado metodologia convencional, de isolamento e identificação. Estes estudos descrevem *E. faecalis* como o microrganismo mais encontrado em canais tratados (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998). Recentemente, novos métodos de identificação bacteriana, mais sensíveis e mais específicos, passaram a ser empregados nestes estudos contribuindo para uma melhor caracterização dos patógenos envolvidos nas infecções endodônticas (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005c).

A utilização de métodos moleculares para detecção microbiana, possibilitou a observação de uma maior incidência de *E. faecalis* nos casos de infecções endodônticas primária e persistente (RÔÇAS *et al.*, 2004). Foi possível observar também uma maior diversidade de microrganismos presentes nas infecções persistentes além da identificação de novas espécies ainda não descritas em infecções endodônticas (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005c). A detecção, através de técnicas moleculares, de espécies não cultiváveis também tem sido descrita (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005b;).

O isolamento de *E. faecalis* em infecções endodônticas, primária e persistente, tornou necessária a elucidação da contaminação bacteriana nos canais previamente tratados. Em canais tratados que permaneceram com o material obturador em contato com a cavidade oral, não é possível determinar de que forma foi estabelecida a contaminação bacteriana. Contudo, nos dentes que apresentam uma adequada restauração, a resistência microbiana ao tratamento

endodôntico realizado, poderia ser explicada como sendo conseqüência da presença do microrganismo dentro do canal. O envolvimento de *E. faecalis* na etiologia do fracasso endodôntico pode estar associado à capacidade deste de sobreviver, por um longo período de tempo, em ambientes com escassez nutricional (SIQUEIRA *et al.*, 1997; LOVE, 2001). Além disso, *E. faecalis* é capaz de penetrar em túbulos dentinários (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; SIQUEIRA, DE UZEDA & FONSECA, 1996), permanecendo viável dentro destes túbulos em dentes *ex vivo* por um período de 60 dias (VIVACQUA-GOMES *et al.*, 2005) a 12 meses (SEDGLEY, LENNAN, APPELBE, 2005). Esta capacidade, possivelmente, permite ao microrganismo evadir-se da ação químico-mecânica do tratamento endodôntico. Outro fator que ainda pode explicar a permanência do microrganismo em canais tratados é a possibilidade de sobrevivência em elevados níveis de pH (DISTEL, HATTON & GILLESPIE, 2002; EVANS *et al.*, 2002), uma vez que tal característica o torna resistente a medicamentos intracanaís como o hidróxido de cálcio (DAHLÉN *et al.*, 2000; ABDULLAB *et al.*, 2004).

No presente estudo, foi realizada a identificação de *E. faecalis* através dos métodos de PCR e cultura com o objetivo de comparar a sensibilidade dos dois métodos. O teste molecular apresentou percentual de detecção de 80% contra 16% obtido através de cultura. Estes valores quando analisados pelo teste do Qui-quadrado mostraram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Nosso elevado percentual de identificação do microrganismo através de teste molecular está de acordo com o apresentado em recentes trabalhos sobre a detecção do patógeno por PCR em canais dentários tratados. Siqueira & Rôças (2004) detectaram *E. faecalis* em 77% ($n = 22$) dos casos e Rôças, Siqueira &

Santos (2004), analisando a associação de *E. faecalis* com os diferentes tipos de doenças perirradiculares, através de PCR, encontraram esta espécie em 67% (n = 30) dos casos refratários.

Em nosso estudo, a reduzida detecção de *E. faecalis* através de cultura (16%) não condiz com o encontrado por Peciulienė e colaboradores (2001), que verificaram a presença de *E. faecalis* em 64% (21) das 33 culturas positivas isoladas de 40 dentes com lesão perirradicular. Nossos resultados se aproximam daqueles obtidos por Hancock e colaboradores (2001) que observaram uma incidência de 30% (10) de *E. faecalis* identificados de 33 culturas positivas isoladas de 54 dentes avaliados a partir de infecções endodônticas refratárias. Contudo, o fato dos resultados do nosso estudo não estarem de acordo com outros da literatura, pode ser justificado pela ocorrência de mais da metade das coletas terem sido realizadas em dentes sem lesão perirradicular. Sundqvist, em 1976, descreveu a correlação entre o número de células bacterianas dentro do canal radicular com a presença e o tamanho da lesão associada ao dente, demonstrando que densidades bacterianas maiores estavam relacionadas em dentes com lesão. Desta forma, no método de cultura é possível o não isolamento microbiano em infecções endodônticas, demonstrando a necessidade de que um número maior de microrganismos esteja presente no canal radicular para sua detecção. Diversos estudos utilizando métodos de cultura para a identificação bacteriana em canais tratados confirmam tal fato, como por exemplo, o de Pinheiro e colaboradores (2003) que não evidenciaram culturas positivas em 6 dos 30 dentes previamente tratados, e o de Hancock e colaboradores (2001), que não

encontraram positividade no meio de cultura para espécimes clínicos coletados de 20 dentes.

A baixa detecção de *E. faecalis* em cultura pode estar relacionada ao não cultivo de certos microrganismos que possuem a capacidade de permanecer viável dentro do canal, porém não são passíveis de crescimento em meios de cultura convencionais. Esta característica, denominada VBNC (viável, mas não cultivável), foi descrita inicialmente em bactérias Gram-negativas (LLEÒ, TAFI & CANEPARI, 1998) e está presente, também, em Gram-positivas, como o *E. faecalis* (LLEÒ, TAFI & CANEPARI, 1998). Esta capacidade de permanecer em estado VBNC é uma estratégia adotada pela bactéria quando exposta a um ambiente sob condições desfavoráveis de crescimento e divisão celular. Lleò e colaboradores, em 2001, demonstraram a capacidade do *E. faecalis* em permanecer por até 3 meses no estado VBNC. O estado VBNC é caracterizado, também, pelo fato da bactéria, mesmo não cultivável, em meio de cultura convencional, permanecer com seu metabolismo ativo, mantendo sua patogenicidade. Quando condições favoráveis são restabelecidas, esta poderá expressar novamente genes e fatores de virulência. Além disso, células de *Enterococcus*, no estado VBNC, apresentam alterações na sua morfologia as quais conferem maior proteção frente às condições, não favoráveis, presentes no ambiente nos quais se encontram (SIGNORETTO *et al.*, 2000). Neste estado VBNC, mantêm sua capacidade de adesão a células humanas mesmo apresentando alterações morfológicas (PRUZZO *et al.*, 2002). Em amostras de *E. faecalis*, presentes dentro de canais dentários tratados, a ocorrência do estado

VBNC poderia ser explicada pela condição ambiental desfavorável encontrada após o tratamento endodôntico.

Em nosso estudo, a comparação entre os métodos de detecção de *E. faecalis* em dentes com canal tratado, mostrou que a PCR foi muito mais sensível do que a cultura. A sensibilidade da PCR na detecção de *E. faecalis* já havia sido comprovada por Molander e colaboradores, em 2002, que observaram a necessidade de apenas 10 células bacterianas ou 10^{-13} g de DNA bacteriano para a identificação de *E. faecalis* através de métodos moleculares.

Vale ressaltar um curioso resultado obtido na detecção de *E. faecalis* a partir de infecções endodônticas. Uma das amostras isoladas de *E. faecalis*, por cultura, apresentou-se negativa por PCR, resultado que se repetiu em três experimentos. Alguns dos prováveis fatores que explicariam tal resultado seriam a influência da distribuição dos cones de papel esterilizados e o volume de DNA bacteriano presente na alíquota utilizada no PCR. Com relação a distribuição dos cones de papel esterilizados, sua possível associação com o resultado se deve a uma possível transferência de um número maior de células bacterianas para um dos meios. Já com relação ao volume de DNA, este foi alterado para 10 μ L, uma vez que o volume inicial presente na alíquota (5 μ L) poderia não ter sido suficiente para produção do amplicon correspondente, porém o resultado se manteve negativo. A presença de algum inibidor no frasco da PCR não pode ser descartada.

Além disso, o método molecular utilizado no presente estudo, confirmou a identificação de uma amostra de *E. faecalis*, considerada atípica para o teste bioquímico MGP. A característica fenotípica discordante não se enquadra na

classificação descrita por Teixeira & Facklam (2003). Entretanto, as características fenotípicas não permanecem estáticas e podem sofrer mudanças em algumas circunstâncias, como por exemplo, pelo estresse (OCHMAN, LERAT & DAUBIN, 2005). Além disso, testes bioquímicos são sujeitos a erro na interpretação (PETTI, POLAGE & SCHRECKENBERGER, 2005; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005b). Conforme discutiremos mais adiante, a partir da análise do perfil de polimorfismo das amostras de *E. faecalis* isoladas, através de rep-PCR, confirmamos a diferença clonal entre a amostra em questão (nº. 44) e as demais estudadas.

Ao avaliarmos a presença de *E. faecalis* nos casos sem lesão perirradicular, dos 27 dentes selecionados, em 22 (81,5%) detectamos o microrganismo por PCR e em 5 (18,5%) por cultura. Dos 23 casos com lesão, o microrganismo foi encontrado em 18 dentes (78,3%) por PCR e em 3 (13%) por cultura. Não houve diferença significativa entre as taxas de detecção de *E. faecalis* nos casos com e sem lesão, independentemente do método de identificação. Como já discutido anteriormente, o método de cultura não possui a capacidade de identificar microrganismos no estado VBNC, entretanto a PCR, mesmo que não possa distinguir células vivas de células mortas, consegue detectar o microrganismo em ambos os estados. Logo, o elevado índice de detecção de *E. faecalis* nos casos sem lesão pode estar associado à presença do microrganismo no estado VBNC, ou seja, nesse estado, o microrganismo não está participando da patogenicidade. Entretanto, futuramente, em condições favoráveis o microrganismo poderia vir a expressar fatores de virulência que provocariam a perpetuação da lesão perirradicular (LLEÒ *et al.*, 2005). Outros fatores devem ser ressaltados que podem justificar a presença bacteriana em todos os casos sem lesão

perirradicular. Dos 27 casos sem lesão analisados, em 11 (40%) foram realizadas coletas de dentes que apresentavam restaurações ausentes ou deficientes, podendo a presença bacteriana estar associada a uma contaminação dos canais radiculares tratados. Além disso, dos 16 casos com restauração definitiva adequada, nos quais a recontaminação não ocorreria, em 06 destes (38%) o limite apical de obturação encontrava-se entre 2 a 5 milímetros aquém do ápice radiográfico (Tabela V), dado este fortemente associado a um tratamento fora dos padrões adequados de desinfecção.

Até o presente momento, poucos são os estudos na literatura que demonstram a presença de *Enterococcus* em canais tratados sem lesão perirradicular. Engström (1964) investigou a ocorrência de *Enterococcus* em diferentes tipos de infecções endodônticas e relatou a identificação deste microrganismo em 24% dos canais tratados com lesão e em 18% dos canais sem lesão perirradicular. Molander e colaboradores (1998) quando examinaram a microbiota existente em 100 canais obturados com e sem lesão perirradicular isolaram *E. faecalis* em 11% dos dentes sem a presença de lesão perirradicular através de cultura. Mais recentemente, Kaufman e colaboradores (2005), analisando por PCR a presença de enterococos em canais de dentes tratados, observaram ser estatisticamente significativa ($p = 0.032$) a diferença entre as taxas de detecção de *E. faecalis* em casos com e sem lesão perirradicular. O estudo mostrou que em 52 dentes com canal tratado, apenas em 6%, foi identificada a presença do microrganismo em casos com lesão e em 23% dos dentes sem lesão. O percentual de identificação de *Enterococcus*, em casos com lesão no estudo de Kaufman e colaboradores (2005), está abaixo dos percentuais encontrados pela

maioria dos trabalhos sobre o assunto, mesmo quando em comparação com estudos que utilizaram a cultura como metodologia de identificação. Os autores concluíram que o microrganismo estaria associado com canais tratados, mas não com a doença perirradicular. Tal relato confirma dados de outros estudos nos quais não foi possível a detecção de *Enterococcus* em canais tratados sem lesão (ROLPH *et al.*, 2001; CHEUNG & HO, 2001). Apesar de alguns autores relatarem que a localização geográfica não influencia na prevalência de *E. faecalis* em canais tratados (Rôças, 2004), a diferença estatística de nossos resultados, quando comparados aos obtidos por Kaufman e colaboradores (2005), em casos com e sem lesão, pode estar sendo influenciada pela diferença geográfica (BAUMGARTNER *et al.*, 2004; SEDGLEY, MOLANDER *et al.*, 2005), embora diferenças metodológicas não devam ser descartadas.

Apesar dos nossos resultados mostrarem um elevado percentual de identificação de *E. faecalis* em canais tratados (80%), seu envolvimento na perpetuação da patologia perirradicular, não está bem determinada. A princípio, mesmo que as radiografias utilizadas na visualização da presença, ou não, da patologia perirradicular sejam examinadas por experientes endodontistas, sabe-se que em alguns casos, a lesão pode não estar sendo observada radiograficamente, mas pode estar presente histologicamente. Vale salientar ainda, que os protocolos utilizados neste estudo, e naquele de Kaufman e colaboradores (2005), somente permitem analisar resultados qualitativos. É possível que o número de células de *E. faecalis* esteja em baixa quantidade nos dentes com canais tratados sem lesão perirradicular. Ou seja, um dos requisitos para o desenvolvimento da doença, a densidade bacteriana, pode não ter sido suficiente ou não tenha havido tempo

para o seu desenvolvimento. Além disso, devemos considerar a diferença de tipos clonais bacterianos, visto que não são todos os microorganismos pertencentes a uma determinada espécie que possuem a mesma capacidade de causar doença. Tipos clonais de *E. faecalis* mais virulentos podem estar presentes em dentes com doença perirradicular. Finalmente, a resistência do hospedeiro pode ser diferente de indivíduo para indivíduo resultando em distintos modelos de resposta a infecção microbiana. Sendo assim, a presença do *E. faecalis* em canais tratados, independente da patologia, em consonância com as considerações descritas anteriormente, reforça o possível papel dos fatores de virulência na patogenicidade das doenças perirradiculares (SIQUEIRA, 2002).

Diversos são os fatores de virulência enterocócicos descritos na literatura (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994; KOCH *et al.*, 2004), porém não há registros significativos da presença destes fatores associados a infecções endodônticas. Os fatores com características de adesão às superfícies, principalmente ao colágeno, na formação de biofilme e os que agem diretamente na hidrólise da gelatina, colágeno e fibrina são os que podem influenciar na perpetuação da doença perirradicular em infecções refratárias (HUBBLE *et al.*, 2003; SEDGLEY, MOLANDER *et al.*, 2005).

A produção da gelatinase por *E. faecalis* vêm sendo estudada para avaliar seu envolvimento na clínica de pacientes com bacteriemias, endocardites e infecções urinárias e orais (SHANKAR *et al.*, 2001; VERGIS *et al.*, 2002; BALDASSARRI *et al.*, 2004; SEDGLEY, LENNAN & CLEWELL, 2004). Nossos resultados apontam para uma grande quantidade de casos (77,5%), com e sem lesão, em que foram identificados o microorganismo, e o gene da gelatinase (*gelE*)

correspondente. Este foi encontrado em 31 dos 40 casos analisados, sendo 17 (55%) com lesão e 14 (45%) sem lesão. A presença do gene, contudo, não condiciona o microrganismo a expressar o fator de virulência, visto que a presença da deleção cromossômica de 23,9 quilobases na região do locus *fsr* impede as amostras de *E. faecalis* de expressar a gelatinase (NAKAYAMA, CAO, HORII, SAKUDA, AKKERMANS *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2004). Nossos resultados obtidos através da detecção fenotípica da gelatinase evidenciam tal fato. Observamos que todas as amostras de *E. faecalis* isoladas de canais tratados (n = 8) apresentaram o gene *gelE* através de PCR, porém apenas 4 (50%) hidrolisaram a gelatina no teste fenotípico. Tal discrepância entre a presença do gene *gelE* e a expressão da gelatinase também foi encontrado por Sedgley, Molander e colaboradores (2005), que encontraram resultados semelhantes quando analisaram diversos fatores de virulência em amostras de *E. faecalis* isoladas de infecções refratárias. Das 6 amostras isoladas, todas apresentando o gene *gelE*, os autores encontraram apenas 2 (33,3%) que expressavam a gelatinase. Em nosso estudo, a correlação entre a detecção do gene *gelE* e a presença de lesão perirradicular não mostrou valor significativo ($p > 0.05$). O papel da gelatinase poderia estar associado à permanência microbiana dentro do canal radicular devido a participação deste microrganismo na formação de biofilme em infecções por *Enterococcus* (HANCOCK & PEREGO 2004; KRISTICH *et al.*, 2004). Entretanto, em estudo recente foi observado que a produção de gelatinase pelo microrganismo não interfere na permanência deste dentro do canal radicular (SEDGLEY, LENNAN & APPELBE, 2005).

Outro fator de virulência descrito em *E. faecalis* é a proteína de superfície enterocócica, codificada pelo gene *esp*, fator este que contribui para colonização e permanência de *E. faecalis* em infecções (SHANKAR *et al.*, 2001; KOCH *et al.*, 2004). Sua importância como mediador na formação do biofilme tem induzido a estudos envolvendo infecções endodônticas (TENDOLKAR *et al.*, 2004). Nosso objetivo inicial era a detecção do gene por PCR, tanto diretamente no espécime clínico, como nas amostras de *E. faecalis*. Contudo, não obtivemos resultados positivos em espécimes clínicos, possivelmente em função de algum inibidor presente no DNA liberado por lise térmica a partir do espécime ou talvez tenha sido baixo o volume de DNA coletado de canais radiculares tratados, diminuindo a sensibilidade da reação. O gene, porém foi encontrado em 3 (37,5%) das 8 amostras de *E. faecalis* isoladas em cultura. Os espécimes clínicos correspondentes às amostras positivas foram retestados, mas mantiveram-se negativos. Apesar da dificuldade encontrada na detecção do gene nos espécimes clínicos, nosso resultado se aproxima do encontrado por Sedgley, Molander e colaboradores (2005) que detectaram o gene em apenas 2 das 6 (33,3%) amostras de *E. faecalis* isoladas de canais tratados.

Apesar da não comprovação da associação do fator de virulência *Esp* na permanência bacteriana em infecções refratárias, estudos *in vitro* demonstraram a forte correlação entre a presença do gene *esp* com a capacidade de amostras enterocócicas de formar biofilme (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001; SENO *et al.*, 2005). Entretanto, esta correlação vêm sendo contestada em recentes estudos (KRISTICH *et al.*, 2004). Estes estudos demonstraram não ser determinante na formação do biofilme a presença do gene *esp*, mesmo quando associado com

outros fatores de virulência já descritos como importantes no desenvolvimento do biofilme, como o gene *geE* (CARNIOL & GILMORE, 2004; SENO *et al.*, 2005).

A análise do polimorfismo através de rep-PCR permitiu a distribuição das amostras isoladas em cinco genótipos diferentes. Apesar do iniciador RW3A ter sido descrito inicialmente para análise genotípica de amostras de *S. aureus*, estudos utilizando-o na diferenciação de espécies de *Enterococcus* obtiveram bons resultados (NAMDARI & DELVECCHIO, 1998; KANG & DUNNE, 2003).

Na caracterização genotípica das amostras de *E. faecalis* coletadas de dentes com lesão, foi observado que duas amostras, 35 e 37, apresentavam um perfil similar, e foram alocadas no genótipo A. A outra amostra (nº.12) associada com lesão não hidrolisou a gelatina e apresentou o gene *esp*, características estas não observadas nas amostras 35 e 37 que não apresentaram o gene *esp*, porém hidrolisaram a gelatina.

As amostras originárias de dentes sem lesão (n = 5) foram distribuídas em 3 grupos genotípicos. As amostras 4 e 45 foram consideradas idênticas e ambas apresentaram as mesmas características fenotípicas e genotípicas (presença do gene *geE*). Estas foram incluídas no genótipo C. As amostras 18 e 29 foram consideradas do mesmo genótipo (D) e diferentemente das demais sem lesão, hidrolisaram a gelatina, apesar de apenas a 29 apresentar o gene *esp*. A amostra 44 foi caracterizada como amostra atípica pelos testes fenotípicos e apresentou um genótipo diferente de todas as demais amostras, confirmando o seu perfil diferenciado. Apenas as amostras 35 e 37, identificadas com percententes a um mesmo clone, foram isoladas de um mesmo paciente. Sedgley, Molander e colaboradores (2005), ao analisarem o polimorfismo genético, através de PFGE,

de amostras clínicas de *Enterococcus* isoladas de infecções endodônticas, evidenciaram uma relação clonal entre amostras da espécie *E. faecalis* isoladas de diferentes pacientes. Contudo, entre as amostras coletadas de canais tratados (n = 6), tal similaridade não foi observada. Em nosso estudo, não foi possível observar um padrão genotípico prevalente entre as amostras estudadas. Contudo, os perfis encontrados em casos sem lesão não estavam presentes naqueles casos onde foi observada lesão perirradicular.

No presente estudo foi observada uma elevada taxa de *E. faecalis* em canais tratados com e sem lesão peirradicular. Embora estes achados aparentemente não confirmem o papel do *E. faecalis* como uma possível espécie envolvida com a falha do tratamento endodôntico, a presença e a caracterização de seus fatores de virulência, bem como a diferença clonal encontrada podem indicar um papel relevante deste microrganismo nas infecções refratárias.

VI Conclusões

Os resultados obtidos no nosso estudo permitiram concluir que:

1 - O método de PCR apresentou maior sensibilidade na detecção de *E. faecalis* (80%) quando comparada à metodologia convencional (16%), sendo a diferença considerada estatisticamente significativa ($p < 0.001$); a presença de *E. faecalis* foi observada em dentes com (78,3%) e sem lesão perirradicular (81,5%), não tendo sido observada diferença significativa entre as taxas;

2 - O gene *gelE* foi detectado por PCR em grande parte dos espécimes positivos para *E. faecalis* em casos com (77,8%) e (77,3%) sem lesão. Com relação à identificação do gene *esp* por PCR, este foi apenas detectado em amostras clínicas (3/8; 37,5%);

3 - Entre as amostras de *E. faecalis* isoladas, em apenas 50%, foi observada a expressão da gelatinase, apesar de todas apresentarem o gene *gelE*;

4 - De acordo com a análise do polimorfismo realizada através de rep-PCR, as oito amostras isoladas de canais tratados foram distribuídas em cinco grupos clonais distintos e, apesar de não ter ocorrido um tipo clonal prevalente, os clones encontrados nos casos sem lesão perirradicular foram diferentes daqueles detectados nos casos com lesão.

VII Referências

ABDULLAH, M.; CLINDENT, M.; NG, Y-L.; GULABIVALA, K.; MOLES, D. & SPRATT, D.A. 2004. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod* **31**:30-36.

ADIB, V.; SPRATT, D.; NG, Y-L & GULABIVALA, K. 2004. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J* **37**:542-551.

ARCHIMABAUD, C.; SHANKAR, N.; FORESTIER, C.; BAGHDAYAN, A.; GILMORE, M.S.; CHARBONNÉ, F. & JOLY, B. 2002. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol* **153**: 75-80.

ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Int Endod J* **11**: 266-273

BALDASSARRI, L.; CRETÍ, R.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; VENDITTI, M. & DI ROSA, R. 2004. Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis. *Clin Microbiol Infect* **10**: 1006-1008.

BAUMGARTNER, J.C.; SIQUEIRA Jr, J.F.; XIA, T. & RÔÇAS, I.N. 2004. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *J Endod* **30**: 141-144.

CARNIOL, K. & GILMORE, M. 2004. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 8161-8163.

CHEUNG, G.S. & HO, M.W. 2001. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* **16**: 332-337.

COLOMBO, A.P.; HAFFAJEE, A.D.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; SMITH, C.M.; CUGINI, M.A. & SOCRANSKY, S.S. 1998. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **25**: 169-180.

CONRADS, G.; GHARBIA, S.E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F. & SHAH, H.N. 1997. The use of a 16 rDNA PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* **23**: 433-438.

COQUE, T.M.; PATTERSON, J.E.; STECKLBERG, J.M. & MURRAY, B.E. 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* **171**: 1223-1229.

DAHLÉN, G.; SAMUELSSON, W.; MOLANDER, A. & REIT, C. 2000. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immun* **15**: 309-312.

DEL VECCHIO, V.G.; PETROZIELLO, J.M.; GRESS, M.J.; McCLESKEY, F.K.; MELCHER, G.P.; CROUCH, H.K. & LUPSKI, J.R. 1995. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 2141-2144.

DISTEL, J.W.; HATTON, J.F. & GILLESPIE, M.J. 2002. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* **28**: 689-693.

DUPONT, H.; MONTRAVERS, P.; MOHLER, J. & CARBON, C. 1998. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect Immun* **66**: 2570-2575.

EATON, T.J. & GASSON, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchanges between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1628-35.

ELSNER, H-A; SOBOTTKA, I.; MARCK, M.; CLAUSSEN, M.; LAUFS, R. & WIRTH, R. 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 39-42.

ENGELBERT, M.; MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F.M.; CALDERWOOD, S.B. & GILMORE, M.S. 2004. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* **72**: 3628-3633.

ENGSTRÖM B. 1964. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* **15**: 87-106.

EVANS, M.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. & FIGDOR, D. 2002. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* **35**: 221-228.

FACKLAM, R.R. & COLLINS, M.D. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* **27**: 731-734.

FACKLAM, R.R. & TEIXEIRA, L.M. 1998. *Enterococcus*. In: Collier, L., Ballows, A. & Susman, M. (ed). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. Edward Arnold. London, United Kindon, p. 669-682.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K. & SUNDQVIST, G. 2003. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microb Immunol* **18**: 234-239.

FOUAD, A.F.; BARRY, J.; CAIMANO, M.; CLAWSON, M.; ZHU, Q.; CARVER, R.; HAZLETT, K. & RADOLF, J.D. 2002. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* **40**: 3223-3231.

FOUAD, A.F.; ZERELLA, J.; BARRY, J. & SPANGBERG, L.S. 2005. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **99**: 112-118.

GOMES, B.P.F.A.; PINHEIRO, E.T.; GADÊ-NETO, C.R.; SOUZA, E.L.R.; FERRAZ, C.C.R.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B. & SOUZA-FILHO, F.J. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* **19**: 71-76.

GORDILLO, M.E.; SINGH, K.V.; BAKER, C.J. & MURRAY, B.E. 1993. Typing of Group B streptococci: comparison of pulsed-field gel electrophoresis and conventional electrophoresis. *J Clin Microbiol* **31**: 1430-1434.

HAAPASALO, M.; RANTA, H. & RANTA, K.T. 1983. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odont Scand* **41**: 19-22.

HAAPASALO, M. & ORSTAVIK, D. 1987. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* **66**: 1375-1379.

HALL, L.M.C.; DUKE, B.; URWIN, G. & GUINEY, M. 1992. Epidemiology of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection in a teaching hospital in London, United Kingdom. *J Clin Microbiol* **30**: 1953-1957.

HANCOCK, L.E. & PEREGO, M. 2004. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol* **186**: 5629-5639.

HANCOCK, H.H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M. & MOISEWITSCH, J. 2001. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **5**: 579-589.

HARTKE, A.; GIARD, J.C.; LAPLACE, J.M. & AUFFRY, Y. 1998. Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4238-4245.

HUBBLE, T.S.; HATTON, J.F.; NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B.E. & GILLESPIE, M.J. 2003. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 121-126.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M. & GILMORE, M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 462-478.

JUNG, I.Y.; CHOI, B.K.; KUM, K.Y.; YOO, T.C. & LEE, C.Y. 2001. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* **92**: 329-334.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R. & FITZGERLD, R.J. 1965. The effects of surgical exposures of dental pulps in *germ-free* and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **18**: 340-348.

KANG, H.P. & DUNNE, M. 2003. Stability of repetitive-sequence PCR patterns with respect to culture age and subculture frequency. *J Clin Microbiol* **41**: 2694-2696.

KAUFMAN, B.; SPÄNGBERG, L.; BARRY, J. & FOUAD, A. F. 2005. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *Jour of Endod.* **31**: 851-856.

KOCH, S.; HUNFNAGEL, M.; THEILACKER, C. & HUEBNER, J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine* **22**: 822-830.

KRISTICH, C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G. & DUNNY, G.M. 2004. Esp-independent biofilm formation by *enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **186**: 154-163.

LIN, L.M.; PASCON, E.A.; SKRINBNER, J.; GÄNGLER, P. & LANGELAND, K. 1991. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **11**: 603-611.

LLEÒ, M.M.; BONATO, B.; TAFI, M.C.; SIGNORETTO, C.; BOARETTI, M. & CANEPARI, P. 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Applied Microbiol* **91**: 1095-1102.

LLEÒ, M.M.; BONATO, B.; TAFI, M.C.; SIGNORETTO, C.; PRUZZO, C. & CANEPARI, P. 2005. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett Applied Microbiol* **40**: 289-294.

LLEÒ, M.M.; TAFI, M.C. & CANEPARI, P. 1998. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming of active growth. *Syst Appl Microbiol* **21**: 333-339.

LOVE, R.M. 2001. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* **34**: 399-405.

MÄKINEN, P.L.; CLEWELL, D.B.; AN, F. & MÄKINEN, K.K. 1989. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (Strain 0G1-10). *J Biol Chem* **264**: 3325-3334.

MALATHUM, K.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 1998. Repetitive sequence-based PCR versus pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Enterococcus faecalis* at the subspecies level. *J Clin Microbiol* **36**: 211-215.

MILLER, W.D. 1894. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* **36**: 505-528.

MOLANDER, A.; LUNDQUIST, P.; PAPAPANOU, P.N.; DAHLÉN, G. & REIT, C. 2002. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J* **35**:1-6.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G. & KVIST, T. 1998. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **31**: 1-7.

MÖLLER, A.J.R. 1966. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* 1-380.

MORRISON, D.; WOODFORD, N. & COOKSON, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symp Supplem* **83**: 89S-99S.

MUNDY, L.M.; SAHM, D.F. & GILMORE, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Reviews* **13**: 513-522.

MURRAY, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* **3**: 46-65.

NAKAYAMA, J.; CAO, Y.; HORII, T.; SAKUDA, S.; AKKERMANS, A.D.L. & DEVOS, W.M. 2001. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiol* **41**: 145-154.

NAKAYAMA, J.; CAO, Y.; HORII, T.; SAKUDA, S. & NAGASAWA, H. 2001. Chemical synthesis and biological activity of the gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* and its analogs. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2322-2325.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R. & KUMON, H. 2002. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Applied and Environ Microbiol* **68**: 3152-3155.

NALLAPAREDDY, S.R.; DUH, R.W.; SINGH, K.V. & MURRAY, B.E. 2002. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **40**: 868-876.

NAMDARI, H. & DELVECCHIO, V. 1998. Application of PCR for characterization of Enterococci. *Clin Microbiol Newsletter*. **20**: 91-98.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE – N.N.I.S. 1997 report, data summary from October 1986-April 1997, issued May 1997. *Am J Infect Control* **25**: 477-87.

NOIRI, Y.; EHARA, A.; KAWAHARA, T.; TAKEMURA, N. & EBISU, S. 2002. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* **28**: 679-683.

OCHMAN, H.; LERAT, E. & DAUBIN, V. 2005. Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6595-6599.

PACHECO, A. B. F.; GUTH, B. E. C.; SOARES, K. C. C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D. F. & FERREIRA, L. C. S. 1997. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* **35**: 1521-1525.

PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERIKSEN, H.M. & HAAPASALO, M. 2000. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* **26**: 593-595.

PECIULIENE, V.; REYNAUD, A.H.; BALCIUNIENE, I. & HAAPASALO, M. 2001. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* **34**: 429-434.

PETTI, C.A.; POLAGE, C.R. & SCHRECKENBERGER, P. 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* **43**: 6123-6125.

PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; GOLD, H.S.; WENNERSTEN, C.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. & INOUE, R.T. 2002. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J Clin Microbiol* **40**: 2651-2652.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A. & SOUZA-FILHO, F.J. 2003. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 100-103.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.M.T. & HAAPASALO, M. 2003. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endod Topics* **6**: 135-159.

PRUZZO, C.; TARSI, R.; LLEÒ, M.M.; SIGNORETTO, C.; ZAMPINI, M.; COLWELL, R. & CANEPARI, P. 2002. In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiol* **45**: 105-110.

QIN, X.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* **68**: 2579-2586.

QIN, X.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M. & MURRAY, B.E. 2001. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* **183**: 3372-3382.

RADCLIFFE, C.E.; POTOURIDOU, L.; QURESHI, R.; HABAHBEH, N.; QUALTROUGH, A.; WORTHINGTON, H. & DRUCKER, D.B. 2004. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* **37**: 438-446.

RANTA, K.; HAAPASALO, M. & RANTA, H. 1988. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod Dent Traumatol* **4**: 269-272.

ROBERTS, J.C.; SINGH, K.V.; OKHUYSEN, P.C. & MURRAY, B.E. 2004. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 2317-2320.

RÔÇAS, I.N. 2004. Infecções endodônticas: análise da microbiota associada a infecções primárias do terço apical de canais radiculares e a infecções persistentes associadas ao fracasso da terapia endodôntica através de métodos moleculares. [Tese Doutorado – Instituto Professor Paulo de Góes – IMPPG/UFRJ]. Rio de Janeiro, Brasil. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. Jr; ABOIM, M.C. & ROSADO, A.S. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**: 741-749.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. Jr & SANTOS, K.R.N. 2004. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* **30**: 315-320.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. JR, SANTOS, K.R.N. & COELHO, A.M. 2001. “Red Complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infection: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* **91**: 468-471.

ROLPH, H.J.; LENNON, A.; RIGGIO, M.P.; SAUNDERS, W.P.; MACKENZIE, D.; COLDERO, L. & BAGG, J. 2001. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* **39**: 3282-3289.

SANTOS, K.R.N.; FONSECA, L.S.; TEIXEIRA, L.M & GONTIJO FILHO. 2001. Typing of *Staphylococcus aureus* from surgical site infections: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR technique using repetitive extragenic palindromic (rep) and Tn916-shine-dalgarno (TnSD) target sequences. *Int J Med Microbiol* **291**: 231-236.

SEDGLEY, C.M.; LENNAN, S.L. & APPELBE, O.K. 2005. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals *ex vivo*. *Int Endod J* **38**: 735-742.

SEDGLEY, C.M.; LENNAN, S.L. & CLEWELL, D.B. 2004. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microb Immun* **19**: 95-101.

SEDGLEY, C.M.; MOLANDER, A.; FLANNAGAN, S.E.; NAGEL, A.C.; APPELBE, O.K.; CLEWELL, D.B. & DAHLÉN, G. 2005. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* ssp. *Oral Microbiol Immun* **20**: 10-19.

SEDGLEY, C.M.; NAGEL, A.C.; SHELBURNE, C.E.; CLEWELL, D.B.; APPELBE, O. & MOLANDER A. 2005. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* **50**: 575-583.

SENO, Y.; KARIYAMA, R.; MITSUHATA, R.; MONDEN, K. & KUMON, H. 2005. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* **59**: 79-87.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.M.; LINDAHL, G. & GILMORE, M.S. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* **67**: 193-200.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S. & JOHNSON, D.E. 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **69**: 4366-4372.

SIFRI, C.D.; MYLONAKIS, E.; SINGH, K.V.; QIN, X.; GARSIN, D.A.; MURRAY, B.E.; AUSUBEL, F.M. & CALDERWOOD, S.B. 2002. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun* **70**: 5647-5650.

SIGORETTO, C.; LLEÒ, M.M.; TAFI, M.C. & CANEPARI, P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied Environm Microbiol* **66**: 1953-1959.

SIQUEIRA, J.F. Jr 2001. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* **34**: 1-10.

SIQUEIRA, J.F. Jr 2002. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**: 281-293.

SIQUEIRA, J.F. Jr, DE UZEDA, M. & FONSECA, M.E.F. 1996. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* **22**: 308-310.

SIQUEIRA, J.F. Jr; MACHADO, A.G.; SILVEIRA, R.M.; LOPES, H.P. & DE UZEDA, M. 1997. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. *Int Endod J* **30**: 279-282.

SIQUEIRA, J.F. Jr & RÔÇAS, I.N. 2004. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol Oral Radiol Endod* **97**: 85-94.

SIQUEIRA, J. F. Jr & RÔÇAS, I. N. 2005a. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *J Clin Microbiol* **43**: 3314-3319.

SIQUEIRA, J. F. Jr & RÔÇAS, I. N. 2005b. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1 – current molecular Technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* **31**: 411-423.

SIQUEIRA, J. F. Jr & RÔÇAS, I. N. 2005c. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2 – redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* **31**: 488-498.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N.; FAVIERI, A. & SANTOS, K.R.N. 2000. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene directed *Polymerase Chain Reaction*. *Oral Microbiol Immunol* **15**: 335-337.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N. & LOPES, H.P. 2004. Microbiologia Endodôntica. In: Lopes, H.P. & Siqueira, J.F. Jr. *Endodontia: Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 223-280.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.M. & SANTOS, K.R.N. 2001a. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA directed PCR. *J Endod* **27**: 164-167.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.M. & SANTOS, K.R.N. 2001b. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* **27**: 563-566.

SIQUEIRA, J.F. Jr; RÔÇAS, I.N.; SOUTO, R.; DE UZEDA, M. & COLOMBO, A.P. 2000. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* **89**: 744-748.

STRUELENS, M.J. & THE MEMBERS OF THE EUROPEAN STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS (ESGEM) OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION DISEASES (ESCMID). 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* **2**: 2-11.

SU, Y.A.; SULAVIK, M.C.; HE, P.; MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R. & CLEWELL, D.B. 1991. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* **59**: 415-420.

SUNDQVIST, G. 1976. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [Dissertation]. Umea, Sweden: University of Umea.

SUNDQVIST, G. 1992. Ecology of the root canal flora. *J Endod* **18**: 427-430.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S. & SJÖGREN, U. 1998. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**: 86-93.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E. & SJÖGREN, U. 1989. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod* **15**: 13-19.

TEIXEIRA, L.M. & FACKLAM, R.R. 2003. *Enterococcus*. In: Murray P.R, Baron E.J., Jorgensen, J.H., Tenover F.C., Tenover P.C. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed., ASM Press, Washington, DC, p 422-33.

TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S. & SHANKAR, N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* **72**: 6032-6039.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GEORING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H. & SWANINATHAN, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **33**: 2233-2239.

TOLEDO-ARANA, A.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J.R. & LASA, I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4538-4545.

TOMAYKO, J.F. & MURRAY, B.E. 1995. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 903-2907.

TOP, J.; SCHOULS, L.M.; BONTEN, M.J. & WILLEMS, R.J. 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 4503-4511.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KLUYTMANS, J. & VERBRUGH, H. 1995. Molecular nosocomial epidemiology: high speed typing of microbial pathogens by arbitrary primed polymerase chain reaction assays. *Infect Control Hosp Epidemiol* **16**: 658-666.

VERGIS, E.N.; SHANKAR, N.; CHOW, J.W.; HAYDEN, M.K.; SNYDMAN, D.R.; ZERVOS, M.J.; LINDEN, P.K.; WAGENER, M.M. & MUDER, R.R. 2002. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* **35**: 570-575.

VIVACQUA-GOMES, N.; GURGEL FILHO, E.D.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; ZAIA, A.A. & SOUZA-FILHO, F.J. 2005. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. *Int Endod J* **38**: 697-704.

WATERS, C.M.; ANTIPOORTA, M.H.; MURRAY, B.E. & DUNNY, G.M. 2003. Role of the *Enterococcus faecalis* gelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol* **185**: 3613-3623.

WILLEY, B.M.; MCGEER, A.J.; OSTROWSKI, M.A.; KREISWIRTH, B.N. & LOW, D.E. 1994. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**: 548-556.

XIA, T.; BAUMGARTNER, J.C. & DAVID, L.L. 2000. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immun* **15**: 273-275.

ZERVOS, M.J.; KAUFFMAN, C.A.; THERASSE, P.M.; BERGMAN, A.G.T.; MIKESELL & SCHABERG, D.R. 1987. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*: an epidemiologic study. *Ann Intern Med* **106**: 687-69.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)