

Iracy Costa

Avaliação da Microbiota Associada
a Osteomielite Crônica dos
Maxilares Através de Meio de
Cultura e PCR

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Alvimar Lima
de Castro

Araçatuba - SP
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

IRACY COSTA

*Avaliação da Microbiota Associada a Osteomielite
Crônica dos Maxilares Através de Meio de Cultura
e PCR*

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente.....: Dr. Alvimar Lima de Castro.
1.º Examinador.....: Dr. Cleverson Luciano Trento
2.º Examinador.....: Dr. Walter Rino
3.º Examinador.....: Dr. Gilberto Aparecido Coclete
4.º Examinador.....: Dr. Elerson Gaetti-Jardim Júnior

Araçatuba, 26 de Fevereiro de 2010.

DADOS CURRICULARES

Nascimento	19 de abril de 1936
Filiação	José Joaquim Costa Maria da Penha Costa
1970 – 1974	Curso de Odontologia na Universidade de Mogi das Cruzes – UMC
1982 – 1984	Curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, Universidade de Marília – UNIMAR
1998 – 2001	Curso de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, Universidade de Marília – UNIMAR
2006 – 2010	Curso de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração Estomatologia, Faculdade de Odontologia Câmpus de Araçatuba, Unesp – Univ. Estadual Paulista

DEDICATÓRIA

Ao Zeca, meu pai, que sonhava grande mas que me ensinou as coisas mais singelas para a vida de um infante, e assim ter uma infância verdadeira. Aprendi a brincar e a ver o mundo com entusiasmo.

A Maria da Penha, a minha mãe, que conseguiu às duras penas me direcionar na vida, com palavras doces, seguras e objetivas e nunca alegou cansaço ou assemelhados, repetindo estórias da sua infância e juventude para eu dormir tranqüilo. Que saudade!

A você Cieli, que embora o trabalho impedisse u´a maior permanência em casa, sempre participou da vida em comum e sempre esteve atenta às mínimas coisas. Lutadora incansável.

A Patrícia, a Preta, minha querida filha, que sem mágoa, enquanto eu estudava, permanecia quieta, para não perturbar o meu estudo, deixando de brincar e assim permitir que eu pudesse chegar até aqui.

A Iurandi, Iure, o Gatão, meu querido filho, que também junto com a “Imã”, procurava não me aborrecer enquanto eu estudava, brincando afastado ou deixando de fazê-lo, dando-me meios para conseguir o meu objetivo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Doutor Mauro Cattani, pelo constante e persistente incentivo através de cobranças diárias e por vezes contundentes, porém necessárias.

A Pedro Thomé, Cirurgião Dentista em Cerquillo, SP, que me despertou através de um chamamento à razão, a necessidade e a oportunidade de uma vida melhor à minha família.

Ao Professor Doutor João Jorge de Barros – J. J. Barros – o meu mestre, o seu mestre, o nosso mestre.

Ao Professor Doutor Walter Rino, que por vezes fico confuso, pois não sei é amigo ou irmão, que nunca me permitiu o esmorecimento e, em inúmeras ocasiões, assumiu a frente e me arrastou pela mão não aceitando o meu desânimo. Um vencedor.

Ao Professor Doutor Alvimar Lima de Castro, que nada o detém, nada o transtorna, mesmo sob as maiores pressões, executa ou resolve todas as tarefas que se lhe apresentem, sempre mantendo o bom humor, sua ferramenta inseparável. Nada lhe é impossível.

A José Marcelo Tamarim (Marcelinho). O que mais posso dizer a respeito do Marcelinho, além de saber que não apenas executa tarefas, mas as vive. Não discuto a sua experiência mas reconheço e enalteço a sua competência e capacidade. Sempre tem uma solução. Faz parte da reduzida fração que pensa.

AGRADECIMIENTO

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos agora são tão pequenos que constrange fazê-los.

Prefiro a homenagem e, se pudesse, cravaria no peito de cada membro da equipe que, há quase 75 anos teve a sua formação iniciada e que ainda não está completa, um medalhão brilhante, chamativo, para mostrar o quanto fez sem nunca pedir uma troca.

Ela nunca me deixou. Empurrou-me morro acima, segurou-me morro abaixo, puxou-me quando cansei, se fez balsa para uma travessia segura de rios caudalosos e pinguela para um riacho. Sempre atenta para as escolhas, corrigiu-me quando necessitava. Algumas vezes e não foram poucas, com muita energia. Outras, me abraçava e sussurrava com muita mansidão como proceder e aqui foram muitas e muitas vezes. Quando por ventura não aceitava a idéia, deixava-me provar o fel da derrota. Não tenho pejo de nenhum dos tombos que levei. Foram oportunos e aprendi com eles. Excelentes mestres.

Hoje desconheço o seu tamanho ou mesmo o número de integrantes. Continuadamente ela cresce e não vai parar por aí. Quanto menos se espera, um novo integrante é agregado, vindo não sei de onde, com disposição para trabalhar e não raro, com a solução para as minhas dificuldades. E assim vamos, cada um ao seu modo, contribuindo para que possamos andar para frente.

Os mais recentes serão citados, mas os demais, que não caíram no esquecimento, não o farei. O espaço é diminuto e eu teria uma réplica de uma lista telefônica.

Ao Bel. Antonio de Almeida Penteado, Delegado de Polícia, que entendeu as minhas necessidades, e me proporcionou meios para que eu pudesse seguir buscando o meu futuro.

Ao Bel. Marcio Prudente Cruz, Delegado de Polícia, que enfrentou idéias retrógradas, dispensou-me atenção e ofereceu toda força necessária para a consecução dos meus ideais.

Aos irmãos Ricardo e Pedro Thomé Filho, que trocaram as férias escolares por aulas particulares e assim eu pude aprender mais.

A Alfredo Campos Pimenta, o Pimenta, colega brilhante, idealista, leal, que nos proporciona um dos mais antigos congressos da história, dando-nos a oportunidade do aprendizado constante, além do exemplo ímpar da persistência em busca de um ideal.

E a vocês, funcionários de laboratórios, de biblioteca, das seções diversas especialmente pós-graduação, e clínica de Estomatologia entre outros, que nos bastidores, às vezes olhando de longe, mantêm a FOA viva, pujante, e vibram com os aplausos recebidos por todos aqueles que passaram pelas suas mãos.

RESUM

RESUMO

A osteomielite crônica de maxila e mandíbula é rara em países industrializados e sua ocorrência, nos países em desenvolvimento, está associada a trauma e procedimentos cirúrgicos, sendo que sua etiologia não foi estudada profundamente. O objetivo desse estudo foi avaliar a microbiota associada com a osteomielite de mandíbula e maxila em pacientes brasileiros. Após exames clínicos e radiográficos, amostras de seqüestros ósseos, secreção purulenta e biopsias de tecido granulomatoso de vinte e dois pacientes com osteomielite crônica da mandíbula e maxila foram cultivadas e submetidas à detecção de um conjunto de patógenos através do método do PCR. O isolamento bacteriano foi realizado em ágar “*fastidious anaerobe*” suplementado com hemina, menadiona e sangue de cavalo, para os microrganismos anaeróbios, e em ágar de tripticaseína de soja suplementado com extrato de levedura e sangue de cavalo, para os aeróbios e anaeróbios facultativos. Cada paciente apresentava uma única lesão. As placas foram incubadas em anaerobiose e aerobiose, a 37°C, por 14 e 3 dias, respectivamente. Bactérias foram cultivadas de 10 amostras de pacientes e os gêneros *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Parvimonas* e *Staphylococcus* foram os mais freqüentes. Através do PCR, DNA bacteriano foi detectado em amostras de 20 pacientes. Os resultados sugerem que as osteomielites crônicas dos maxilares geralmente são infecções anaeróbias mistas, reforçando o conceito de que estão relacionadas principalmente aos microrganismos do ecossistema bucal e que as infecções periapicais e periodontais podem atuar como fatores predisponentes.

Palavras-chave: osteomielite, bactérias, anaeróbios, maxila, mandíbula.

ABSTRACT

ABSTRACT

Chronic osteomyelitis of the maxilla and mandible is rare in industrialized countries and its occurrence in developing countries is associated with trauma and surgery, and its microbial etiology has not been studied thoroughly. The aim of this investigation was to evaluate the microbiota associated with osteomyelitis of the mandible and maxilla from some Brazilian patients. After clinical and radiographic evaluation, samples of bone sequestra, purulent secretion, and biopsies of granulomatous tissues from twenty-two patients with chronic osteomyelitis of the mandible and maxilla were cultivated and submitted for pathogen detection by using a PCR method. Each patient harbored a single lesion. Bacterial isolation was performed on fastidious anaerobe agar supplemented with hemin, menadione and horse blood for anaerobes; and on tryptic soy agar supplemented with yeast extract and horse blood for facultative bacteria and aerobes. Plates were incubated in anaerobiosis and aerobiosis, at 37°C during 14 and 3 days, respectively. Bacteria were cultivated from ten patient samples; and genera *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*, and *Staphylococcus* were the most frequent. By PCR, bacterial DNA was detected from thirteen patient samples. The results suggest that cases of chronic osteomyelitis of the jaws are usually mixed anaerobic infections, reinforcing the concept that osteomyelitis of the jaws are mainly related to microorganisms from the oral environment, and periapical and periodontal infections may act as predisposing factors.

Key-words: osteomyelitis, bacteria, anaerobes, maxilla, mandible.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

PCR	“Polymerase chain reaction”
VMGA III	Viability medium Göteborg Anaerobic III
VMG I	Viability medium Göteborg I
μl	microlitro
°C	grau centrígrado ou Celsius
DNA	ácido desóxirribonucléico
PBS	“phosphate buffered saline” ou solução salina fosfatada tamponada
μM	micromolar
μg/ml	micrograma por mililitro
N ₂	nitrogênio (gás)
H ₂	hidrogênio (gás)
A _{260 nm}	comprimento de onda em nanômetros (260nm)
1X PCR/Mg ⁺⁺	solução tampão de cloreto de magnésio na concentração de uso
mM	milimolar
dNTP	bases nitrogenadas sintéticas
pH	concentração hidrogeniônica
UV	luz ultravioleta
%	percentagem
RTF	Reduced Anaerobic Fluid
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	História clínica – dados de pacientes com osteomielites	60
Tabela 2	Microrganismos cultivados de 22 casos de osteomielites crônicas dos maxilares	61
Tabela 3	Microrganismos detectados por PCR de 22 casos de osteomielites crônicas dos maxilares	62

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo	XII
Abstract	XIV
Introdução	22
Proposição	34
Material e Métodos	36
Resultado	41
Discussão	43
Conclusão	50
Referência	52
Anexos	58

INTRODUÇÃO

Introdução e Revisão de Literatura

As osteomielites do esqueleto maxilofacial, em particular da mandíbula e maxila são raras em países desenvolvidos (Yeoh et al., 2005), mas sua ocorrência em países em desenvolvimento é mais freqüente e de origem incerta, embora as condições precárias de higiene oral da população geral possam influir nesse fenômeno. Essas infecções, em certos pacientes, podem provocar fraturas ósseas e se mostrar refratária ao tratamento cirúrgico e antimicrobiano, complicando sobremaneira o tratamento (Van Merkesteyn et al., 1997).

As osteomielites são tradicionalmente divididas em osteomielites de origem hematogênica e adjacentes a processos infecciosos, sendo que, independentemente da associação ou não com outras patologias infecciosas já existentes, a forma crônica é a mais freqüente nos maxilares (Mader et al., 1999).

Essas infecções podem ficar restritas a um único sítio ou se disseminarem para outras áreas da medula óssea, tecido ósseo e mesmo tecidos moles adjacentes (Lew & Waldvogel, 2004), podendo produzir quadros infecciosos sistêmicos, particularmente em pacientes cuja resposta tecidual e imunológica se mostrem alteradas, como diabéticos não controlados, pacientes hospitalizados e/ou imunocomprometidos (Brady et al., 2006).

O tratamento dessas infecções freqüentemente envolve a remoção dos sequestros ósseos e, por vezes, decorticação associada a terapia antimicrobiana sistêmica (Van Merkesteyn et al., 1997), sendo que a escolha da droga antimicrobiana, além dos aspectos de farmacocinética e farmacodinâmica, deve levar em consideração a composição da microbiota associada a essas condições clínicas. Entretanto, os aspectos microbiológicos das infecções de

cabeça e pescoço, a despeito de um padrão geral, apresentam peculiaridades regionais ou nacionais, o que limita as extrapolações para o estabelecimento de protocolos terapêuticos adequados, principalmente em países em desenvolvimento, onde o fenômeno da automedicação é relevante (Ávila-Campos et al., 2006), o que pode modificar a microbiota envolvida originalmente nesses processos.

Em teoria, a redução do suprimento sanguíneo junto ao tecido ósseo, como ocorre em lesões traumáticas, pacientes irradiados, na presença de tecido necrótico ou material exógeno, pode criar condições favoráveis aos microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos bucais, particularmente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Treponema denticola*, cujo principal habitat é o sulco gengival e são frequentemente envolvidos nas infecções odontogênicas. Nessas condições, esses microrganismos poderiam proliferar e participar do desenvolvimento das osteomielites nos maxilares.

Desde que o diagnóstico microbiológico passa a ser fundamental para complementar o diagnóstico clínico e é relevante no estabelecimento e acompanhamento do tratamento medicamentoso, tornam-se bastante problemáticas as limitações dos métodos convencionais de cultura para detecção de microrganismos de crescimento mais exigente, o que pode levar de vários dias a semanas, o que diminui significativamente a possibilidade de influir no tratamento medicamentoso. Nesse sentido, os métodos de diagnóstico molecular se converteram em uma importante ferramenta na identificação das

espécies microbianas bucais, principalmente os mais exigentes (Ávila-Campos et al., 2002; Jervoe-Storm et al., 2007).

As osteomielites crônicas secundárias de mandíbulas, embora sejam comumente associadas com traumatismos, procedimentos cirúrgicos e infecções prévias como infecções endodônticas periapicais, a incidência com relação a esses detalhes, clínica e etiologicamente ainda não foi estudado, o que é notável, visto que representam aproximadamente 80-90% das osteomielites dos maxilares em pacientes oriundos de países em desenvolvimento (Prasad et al., 2007). Entre os ossos de crânio, a osteomielite crônica é observada mais frequentemente na mandíbula e, mais raramente, na maxila, quase sempre limitada a um sítio anatômico (Baltensperger et al., 2004; Lew & Waldvogel, 2004), embora possa se disseminar para outras áreas, especialmente em pacientes diabéticos, imunossuprimidos, e hospitalizados entre outros (Brady et al., 2006).

A disseminação de microrganismos comensais hematógenos ou exógenos pode estar associada à patogênese dessas doenças, mas geralmente a principal fonte de microrganismos envolvida na osteomielite dos maxilares reside no biofilme dental e infecções orais, particularmente infecções endodônticas (Brady et al. 2006), peri-implantites, periodontites e gengivites (O'Sullivan et al., 2006; Coviello & Stevens, 2007).

Aspectos Clínicos e Radiográficos

Embora a idade não tenha um papel principal na incidência de osteomielite maxilar, é mais frequente em adolescentes e adultos entre 40 e 60

anos (Baltensperger et al., 2004). A osteomielite maxilar crônica pode ser classificada em dois grupos principais: osteomielite crônica primária onde a doença sempre apresenta sintomas crônicos, e osteomielite crônica secundária, que representa a evolução de uma osteomielite aguda prévia ou a disseminação local de infecções odontogênicas crônicas. Osteomielites crônicas primárias têm um começo clínico insidioso e manifestações radiográficas podem levar semanas para ficarem evidentes (Kim & Jang, 2001), considerando-se que a osteomielite aguda geralmente leva em média quatro semanas para se tornar uma infecção crônica (Lew & Waldvogel, 2004).

Nos últimos quinze anos, foram vistos quarenta e cinco pacientes com osteomielite crônica secundária mandibular em uma escola de Odontologia, observando-se dor na região do osso afetado em 68,9% dos casos, edema (37,4%), secreção purulenta (31,1%), lesões osteolíticas (82,2%), condensação óssea (91,1%), e sequestro ósseo (64,4%) como ocorrências clínicas e radiográficas mais comuns. Embora não frequente, fístula intraoral foi observada em 8,9% dos pacientes com osteomielite, e fístula extraoral em 4,4%, eritema (4,4%), espessamento periosteal e irregularidades ósseas (8,9%), particularmente em pacientes jovens, como também referido na literatura (Kim & Jang, 2001; Baltensperger et al., 2004). Em 26,7%, a osteomielite foi associada a um procedimento iatrogênico, geralmente depois de fratura de mandíbula ou tratamento endodôntico.

As características radiográficas de osteólise observadas na osteomielite crônica da maxila e mandíbula são mais evidentes em pacientes mais jovens; enquanto que a condensação de osso é mais frequente em adultos,

particularmente em lesões mandibulares. Porém, essas características são modificadas frequentemente através de automedicação com drogas anti-inflamatórias e antimicrobianas. Além disso, os sinais clínicos e radiográficos podem variar de acordo com o fator predisponente, como infecções odontogênicas, fratura óssea e dental, presença de neoplasia, uso de bifosfonados, lúpus sistêmico, mieloma múltiplo e radioterapia para câncer de cabeça e pescoço (Prasad et al., 2007; Rush et al., 2007; Brook, 2008b).

Aspectos Microbiológicos

As características da microbiota associada a osteomielites maxilares dependem da origem do processo infeccioso, origem de hematógenos, ou extensões diretas de processos infecciosos orais. No primeiro caso, é notória a relevância de microrganismos tolerantes, como linhagem de microrganismos entéricos e estafilococos, enquanto que na segunda condição a microbiota da osteomielite dependerá da microbiota do processo infeccioso prévio e onde ocorreu (Brook, 2008b). A frequência da osteomielite hematogênica na mandíbula é desconhecida, embora bacteremia associada a trauma e procedimentos dentais como escovação sejam comuns.

Na maxila e mandíbula, os casos de osteomielite crônica polimicrobiana e as fontes principais dos microrganismos infectantes são odontogênicos, produzindo uma média de 2,4 a 3,9 espécies de anaeróbicos restritos e 0,4 a 1,3 aeróbio ou espécies de anaeróbicos facultativos por lesão (Brook, 1986). Os microrganismos orais mais comumente descobertos em

osteomielites são representados através de linhagens de anaeróbicos Gram-negativos, a maioria delas consideradas patógenos periodontais, e cocos anaeróbicos facultativos do gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus*.

O papel dos estreptococos orais em osteomielites crônicas mandibulares não é essencial (Zuluaga et al., 2006; Brook, 2008b), mas esses microrganismos provêm condições ambientais satisfatórias provavelmente para o estabelecimento de anaeróbicos restritos no osso (Baltensperger et al., 2004). Em pacientes com uma história de trauma dental ou fratura mandibular, como também abuso de drogas antimicrobianas, a presença de estafilococos e linhagens de enterococos, particularmente fecais, deve ser considerada (Scolozzi et al., 2005; Zuluaga et al., 2006; Brook, 2008b).

Alguns casos de osteomielite crônica das mandíbulas são tolerantes ao tratamento de antimicrobianos e frequentemente são descobertos actinomicetes nessas situações. O gênero *Actinomyces* está composto através de linhagens de aeróbicos Gram-positivos, às vezes resistentes a drogas antimicrobianas (Brook, 2008b), e *A. israelii* é a espécie mais pertinente, particularmente para as infecções de cabeça e pescoço (Sharkawy, 2007). Algumas evidências sugestionam a participação de *Actinomyces* spp. e *Propionibacterium acnes* na etiologia da osteomielite esclerosante difusa da mandíbula (Baltensperger et al., 2004).

A presença de odor fétido é geralmente associada com anaeróbicos restritos do gênero *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Parvimonas*, que podem invadir os tecidos ativamente pela produção de proteases

e exopeptidases, podendo sobreviver e proliferar dentro de lesões osteolíticas com pobre provisão de sangue (Brook, 2008a).

Coleta de material para análise bacteriológica

Para se determinar o agente microbiano etiológico da osteomielite mandibular e a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos, o primeiro passo é a coleta de amostra. A coloração de Gram pode colaborar para determinar o morfotipo bacteriano presente na lesão óssea e pode guiar a seleção de terapia antimicrobiana.

Embora procedimentos convencionais como cultura mostrem menor sensibilidade quando comparados a métodos moleculares como PCR, a cultura permite a determinação de padrões de suscetibilidade microbiana. Para o diagnóstico de osteomielite microbiana crônica, só biópsia de osso, sequestro ósseo, medula óssea, tecido de granulação e amostras de pus aspirado são aceitáveis para identificação microbiana. Para se evitar contaminação secundária de microrganismos orais, os espécimes clínicos devem ser coletados através de procedimentos cirúrgicos, evitando-se contato com os tecidos orais, ambiente oral e áreas de seios paranasais (Prasad et al., 2007). Quando o osso for removido por biópsias, deve-se preferir áreas da margem da lesão osteolítica.

Para o isolamento de organismos anaeróbicos, alguns meios de transporte pré-redutores dos espécimes, como o VMGA III ou RTF devem ser empregados. Aspiração de conteúdos sépticos amolecidos de lesão óssea com seringas é adequada, evitando-se contato danoso da amostra com oxigênio. A

inobservância desses detalhes, como também condições inadequadas de controlar o cultivo, determina a alta frequência de osteomielite mandibular aparentemente estéril. Porém, até mesmo em condições ideais, a frequência de culturas positivas pode ser muito modesta (Baltensperger et al., 2004), principalmente no caso de pacientes que utilizam automedicação por muito tempo em dose ineficaz ou com prescrição imprópria

Somando-se a isto, quando a descoberta molecular de patógenos for possível ou desejável, a preocupação mais importante é onde adquirir os espécimes na lesão de osso, evitando-se contato com ambiente oral, considerando-se que tanto PCR como PCR em tempo real têm alta sensibilidade a resultados falso-positivos, que podem ocorrer depois de contaminação acidental da amostra.

Tratamento

O tratamento dessas infecções depende de sequestrectomia, debridamento cirúrgico da ferida, e remoção da cortical óssea, associado ao uso sistêmico de antimicrobianos (Lew & Waldvogel 2004; Coviello & Stevens, 2007; Brook, 2008b). Porém, quando o clínico não pode proceder o tratamento cirúrgico local ou devido a microbiota associada ao processo infeccioso (Brook, 2008b), ou peculiaridades de estruturas anatômicas, ou ainda quando a droga antimicrobiana prescrita inicialmente não é eficiente, é necessário se refazer o diagnóstico microbiológico para se determinar qual droga deverá ser usada (Kim & Jang 2001; Coviello & Stevens, 2007), além disso, a maioria dos

microrganismos envolvidos na patogênese da osteomielite maxilomandibular é anaeróbica, muitos deles resistentes e de difícil cultivo (Kim & Jang, 2001; Coviello & Stevens, 2007; Brook, 2008b).

A ocorrência, tipo, severidade e prognóstico da osteomielite crônica das mandíbulas dependem de muitos fatores, incluindo a composição e virulência da microbiota, resposta imunológica do hospedeiro, extensão e severidade da infecção, como também a fonte da infecção (Brady et al., 2006). As análises da literatura como também a experiência no isolamento e caracterização de microrganismos orais, sugerem que as osteomielites crônicas das mandíbulas devem ser tratadas como uma infecção anaeróbica mista na maioria das vezes, mas, ao enfrentar um uso prévio de drogas antimicrobianas, procedimentos cirúrgicos ou trauma estendido, a possibilidade da participação de microrganismos da pele, ambiente externo ou área digestiva deve ser levada em conta.

Em geral, osteomielites recebem tratamento sintomático além da imobilização da maxila em casos de fraturas, tratamento antimicrobiano intravenoso ou oral durante 4 a 8 semanas, com uma média de duração de 31 dias (Brook, 2008b), além da remoção cirúrgica do tecido necrótico e a drenagem do conteúdo séptico, a osteomielite crônica primária é muito mais refratária a tratamentos cirúrgicos e antimicrobianos que a osteomielite crônica secundária.

Osteomielite é uma doença cirúrgica, portanto, um completo debridamento cirúrgico é mais importante que um regime antibiótico para um bom resultado. Nesses casos, dados sobre uso prévio de agentes antimicrobianos é pertinente, considerando-se que essas drogas podem afetar a suscetibilidade dos

microrganismos nas infecções de cabeça e pescoço, especialmente osteomielites, onde o tratamento dura semanas (Coviello & Stevens., 2007; Brook., 2008b).

Quando o paciente não tem uma história de uso prévio de β -lactâmicos, amoxicilina ou cefalexina é prescrito durante 3-4 semanas (500 mg via oral, três vezes ao dia). Outro β -lactâmico, como outra cefalosporina e carbapenema, também são boas opções terapêuticas (Mandracchia et al., 2004), embora o número de isolados do gênero *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Prevotella β -lactamases* esteja aumentando significativamente (Handal et al., 2004; Al-Haroni et al., 2008), além do estafilococo, resistente a quase todas as drogas disponíveis (Brook, 2008b).

Porém, para pacientes com história de uso prévio de amoxicilina e/ou β -lactâmicos, clindamicina é a escolha (600 mg via oral, duas vezes ao dia, durante 30 a 60 dias). Em casos refratários devido a presença de linhagem entérica Gram-negativa e anaeróbicos, terapia de oxigenação hiperbárica adicional (HBO) associada com tratamento intravenoso inicial com ciprofloxacina (100 mg duas vezes ao dia) e clindamicina (600 mg duas vezes ao dia) durante uma semana, seguindo-se antibioticoterapia oral com estas drogas durante quatro semanas é o procedimento padrão (Scolozzi et al., 2005). Devem ser avaliados resultados de tratamento a intervalos de 6 meses pelo período de pelo menos 18-meses.

Clindamicina é frequentemente utilizada no tratamento de infecções anaeróbicas associadas com microrganismos orais, evidenciando excelente eficácia nas infecções ósseas e biodisponibilidade oral (Lew & Waldvogel, 2004; Le Moal et al., 2005) e é um antibiótico apropriado para a

maioria das bactérias Gram-positivas, inclusive *Staphylococcus aureus* (Gutierrez, 2005). Se *Staphylococcus aureus* são metilcilina-resistentes (taxas locais de MRSA são 5%-10%), tratamento intravenoso com vancomicina ou clindamicina é indicado (Gutierrez, 2005).

Os microrganismos anaeróbicos Gram-negativos resistentes a β -lactâmicos tradicionais são sensíveis à associação dessas drogas e inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, sulfactam ou tazobactam, e metronidazol, por exemplo. Porém, metronidazol não é recomendado como monoterapia antimicrobiana, considerando-se que a maioria dos anaeróbicos Gram-positivos é tolerante, e quase todos anaeróbicos facultativos são naturalmente resistentes a esta droga. (Gaetti-Jardim et al., 2007). Portanto, deve-se reservar metronidazol para ser usado em associação com outras drogas, particularmente β -lactâmicos, especialmente para os casos mais agudos.

PROPOSIÇÃO

Proposição

O presente estudo objetivou avaliar, através de cultura e PCR, a microbiota associada às osteomielites crônicas de maxila e mandíbula, em uma população de baixa renda com histórico de condições de saúde bucal precárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

População estudada e obtenção de amostras

Foram envolvidos neste estudo 22 pacientes, compreendendo 14 homens e 08 mulheres, com idade entre 13 e 67 anos (idade média de 51,43 anos). Todos os pacientes deram consentimento por escrito para o recrutamento para o estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp – Univ. Estadual Paulista (Processo FOA 2009/01040). Como critério de inclusão, os pacientes deveriam apresentar sinais clínicos e/ou radiográficos de osteomielite crônica supurativa. O uso, através de automedicação, de antimicrobianos sistêmicos previamente ao estudo constituiu critério de exclusão, bem como a existência de doenças sistêmicas que inviabilizassem a coleta dos espécimes clínicos.

Inicialmente se procedeu à anamnese, em formulários padronizados, constando a identificação do paciente, idade, aspectos étnico-raciais, história da doença atual, história médica e familiar, seguido do exame clínico-radiográfico da lesão óssea e dos tecidos periodontais e elementos dentais. Após a avaliação clínico-radiográfica da lesão, foi realizada a coleta de material pela aspiração do conteúdo da cavidade óssea. Nos casos em que a cavidade não possuía quantidade significativa de conteúdo líquido, fluido ou pastoso, 1ml de solução salina pré-reduzida foi empregado para banhar a lesão e era imediatamente aspirado. Sequestros ósseos ou biópsias incisionais também foram coletados.

O conteúdo aspirado das lesões ósseas foi imediatamente transferido para meio de transporte VMGA III (Möller, 1966), para reduzir o contato

das amostras a serem submetidas ao cultivo microbiológico com o oxigênio atmosférico, e para criotubos contendo 300 µl de água ultrapura Milli Q, que seriam armazenados a 196°C negativos, para a extração do DNA bacteriano. Após a coleta dos espécimes clínicos, os pacientes foram submetidos ao tratamento inicial.

Foram realizadas biopsias tanto de tecido ósseo aparentemente íntegro, quanto de seqüestro ósseo e de tecido granulomatoso. Os tecidos biopsiados foram fixados em formalina PBS 4%, descalcificados (no caso de tecido ósseo) e processados de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório. O material biopsiado foi embebido em parafina e submetido a cortes semi-seriados de 6 µm de espessura. De cada bloco de parafina, 3 a 5 cortes foram realizados, corados com hematoxilina-eosina e examinados à microscopia de luz (Leica Microsystems, Bensheim, Germany). De maneira geral, os antimicrobianos foram prescritos por 30 a 90 dias.

Os espécimes clínicos foram processados no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia Câmpus de Araçatuba, Unesp – Univ. Estadual Paulista. Os espécimes em VMGA III foram submetidos a diluição em caldo VMG I e, de diluições pré-estabelecidas, alíquotas de 0,1 mL eram inoculadas em ágar “Fastidious Anaerobe” enriquecido com hemina (1 µg/ml), menadiona (5 µg/ml), extrato de levedura (0,5%) e sangue de cavalo desfibrinado (5%), incubados em anaerobiose (85% N₂ + 10% H₂ + 5% CO₂), a 37°C, por 7 a 21 dias, para isolamento de anaeróbios de cultivo exigente.

Espécimes clínicos foram também incubados em ágar de tripticaseína de soja suplementado com extrato de levedura (0,5%) e incubados em

aerobiose a 37°C, por 24-48 h, para isolamento de aeróbicos e microrganismos facultativos.

Após o isolamento, culturas puras foram obtidas e os isolados foram submetidos a análise morfo celular e morfo colonial, teste respiratório e prova da catalase. A seguir, foi realizada identificação dos isolados quanto ao nível de genes e, sempre que possível, quanto ao nível de espécies, utilizando-se “kits” comercial (BioMerieux SA, Marcy-l’Etoile, France) e fermentação de carboidrato (GOMES et al., 2004).

Detecção dos patógenos por PCR

A extração de DNA de cada amostra coletada em água ultrapura Milli-Q foi realizada utilizando-se QIAamp DNA Mini Kit e QIAamp Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. As concentrações de DNA bacteriano foram determinadas por espectrofotômetro (Beckman, Model DU-640, USA), a $A_{260\text{ nm}}$.

A presença de *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *Campylobacter rectus*, *Dialister pneumosintes*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacteriaceae*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram também detectadas pelo PCR, utilizando-se pares de iniciadores específicos.

Amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl contendo 1X PCR/Mg⁺⁺ tampão (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, USA), 0,2

mM em cada dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 0,5 U *Taq* DNA polimerase (Boehringer Mannheim), 0,4 μ M de cada par de iniciadores and 10 ng de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (Amplitherm GeneAmp PCR System, Norwalk, CT, USA) programado para 94°C (5 min), seguido por 36 ciclos a 94°C por 30 segundos; temperatura de anelamento adequada temperatura para cada par de iniciadores, por 30 segundos a 1 minuto; 72°C por 30 segundos a 1 minuto, seguidos por um ciclo final a 72°C, por 5 minutos, para permitir a completa extensão do DNA.

Um controle negativo sem padrão de DNA foi incluído em cada PCR. Os produtos amplificados foram comparados por eletroforese em 1% agarose gel em tampão 1X TBE (1 M Tris, 0.9 M ácido bórico, 0,01 M EDTA, pH 8.4) tampão (Gibco BRL, Life Technologies, Ltd., Bethesda, MD, USA), corados com ethidium bromide (0,5 mg/ml), e fotografados com um transiluminador UV (Kodak Digital Science System 120).

RESULTADO

Resultado

Os resultados do presente estudo evidenciaram a presença de conteúdo séptico em 20 (90,9%) dos casos de osteomielite crônica em maxila e mandíbula. A maioria dos espécimes clínicos revelou a presença de no mínimo três diferentes espécies microbianas (63,6%), das quais dois pacientes apresentavam infecção monomicrobiana relacionada com *Streptococcus oralis* e um caso associado a *Staphylococcus* spp. Infecções monomicrobianas relacionadas aos anaeróbios obrigatórios não foram detectadas e estes estiveram presentes em associação com cocos e bastonetes anaeróbios facultativos.

Os 20 casos com cultura bacteriana positiva ou detecção positiva de microrganismos pelo PCR mostrou a presença de microbiota bacteriana anaeróbica mista. Os gêneros mais frequentemente detectados e cultivados foram *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Parvimonas*, *Campylobacter*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, e *Porphyromonas*. Outros microrganismos, transitórios da cavidade oral, como *Propionibacterium acnes*, enterobactérias e *Staphylococcus* spp. também puderam ser observados.

A detecção dos principais patógenos oportunistas por PCR evidenciou a presença de microrganismos anaeróbios de cultivo mais exigente, como *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, evidenciando uma microbiota complexa.

DISCUSSÃO

Discussão

Diferentes condições clínicas podem levar ao desenvolvimento de infecções que atingem a medula óssea da mandíbula e maxila. Sua origem está associada às bacteremias e disseminação hematogênica, bem como disseminação a partir de infecções locais, como mais comumente ocorre na região dos maxilares (Rush et al., 2007). Contudo, a microbiota normalmente associada às bacteremias transitórias em odontologia, reflete a própria microbiota bucal, dificultando a determinação das condições que podem ter originado a osteomielite.

Embora a mandíbula seja o osso mais frequentemente afetado pela osteomielite crônica, os fatores associados com este fenômeno permanecem obscuros, bem como a ocorrência desse tipo de osteomielite em outras espécies animais como cachorros, gatos e mamíferos marinhos. É provável que isto ocorra pelo fato da estrutura óssea mandibular ser menos plástica que o osso da maxila, podendo permitir persistência microbiana, como também aumento da vulnerabilidade a trauma (Sharkawy, 2007) e incidência mais alta de fatores predisponentes como pericoronarites (Betts et al., 1996). Outras peculiaridades do osso mandibular incluem exuberante formação óssea reativa periférica, enquanto esta característica é rara na maxila (Betts et al., 1996).

A microbiota de casos de osteomielite crônica de mandíbula e maxila em países em desenvolvimento permanece sem o devido esclarecimento devido à carência de centros capacitados para o isolamento e/ou detecção molecular de microrganismos de cultivo mais exigente, como membros dos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema* e *Dialister*, entre outros. As implicações dessa falha são graves e podem trazer conseqüências sérias para o paciente, desde

que os procedimentos de cultura e antibiograma deixam de acrescentar informações que seriam valiosas como auxiliares do tratamento, particularmente quando se observa que alguns desses microrganismos são reconhecidos por sua resistência aos antimicrobianos, particularmente aos β -lactâmicos, muito empregados no tratamento das infecções de cabeça e pescoço.

Assim, desde que a microbiota freqüentemente isolada da corrente sanguínea apresenta notáveis semelhanças com aquela apresentada na tabela 2 (Takai et al., 2005) ou com a microbiota associada às infecções endodônticas e periapicais (Gomes et al., 2004; ou periodontais (Yamaura et al., 2005; Jervoe-Storm et al., 2007), torna-se difícil a determinação da origem do processo, a despeito do histórico de trama cirúrgico e a presença de infecções orofaciais próximas. Entretanto, direta ou indiretamente, a cavidade bucal é fonte da grande maioria dos microrganismos que colonizaram as lesões ósseas, independentemente da via de acesso aos tecidos do hospedeiro.

Segundo Fenollar et al. (2006), os procedimentos convencionais de cultura ou apenas a realização do esfregaço para avaliação da contaminação microbiana nas infecções envolvendo tecido ósseo não oferecem subsídios adequados ao clínico, sendo que o empirismo durante o planejamento e implementação do tratamento, são procedimentos que levam a um prognóstico pobre. Assim, a associação de métodos moleculares, como o PCR, pode oferecer, ao clínico, informações sobre a complexidade da microbiota envolvida nessas infecções e, ao contrário do cultivo de microrganismos anaeróbios, que pode levar semanas, fornece dados relevantes em poucas horas.

A microbiota isolada através de cultura ou detectada através dos métodos moleculares apresenta características que muito se assemelham à microbiota periodontal, com a adição de espécies exógenas à cavidade bucal, como a ocorrência de microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus*, que embora possam ser detectados na cavidade bucal humana, não são considerados como membros da microbiota bucal normal. Esses microrganismos podem ganhar a corrente circulatória e se alojar em órgãos e tecidos distantes, sendo causa freqüente de endocardite séptica (Breitkopf et al., 2005).

A presença de diferentes espécies anaeróbias bucais em infecções mistas sugere que as associações ecológicas são relevantes no desenvolvimento das osteomielites dos maxilares, como também observado no presente estudo. Esses anaeróbios também dependem de condições locais ou sistêmicas favoráveis, desde que possuem virulência moderada e raramente se implantam profundamente nos tecidos.

Dentre os microrganismos cultivados, destacam-se os membros dos gêneros *Streptococcus* e *Actinomyces*, sendo que devido sua ampla distribuição na cavidade bucal, como parte da microbiota normal do biofilme subgingival e supragingival, da língua e mucosas lisas, é problemática a avaliação desempenhada pelos mesmos no desenvolvimento da osteomielite crônica. Contudo, para os estreptococos bucais, as evidências têm sugerido que esses microrganismos anaeróbios facultativos poderiam criar condições para a implantação e multiplicação de microrganismos mais exigentes, como os anaeróbios obrigatórios, mas não se pode esquecer que condições bacterêmicas em que esses cocos estão presentes

representam sério fator predisponente para o desenvolvimento da endocardite séptica.

O papel desempenhado pelos diferentes microrganismos detectados através de cultura e PCR precisa ser melhor avaliado, desde que os mesmos parecem formar comunidades e são capazes de induzir reabsorção e necrose do tecido ósseo. Nesse sentido, destacam-se os membros do grupo dos actinomicetos, em particular *A. israelii*, que se mostra tolerante a vários antibióticos utilizados no tratamento das infecções orofaciais e foi detectado junto a osso necrótico em casos de osteorradionecrose (Hansen et al., 2006), sendo que a ocorrência de traumas locais como extrações parece facilitar a implantação desse grupo microbiano. A participação de microrganismos do gênero *Actinomyces* se mostra mais relevante quando se verifica que os mesmos estiveram presentes nos 4 pacientes que receberam antimicrobianos por períodos mais prolongados e no único caso clínico que foi submetido à terapia com oxigênio hiperbárico. Como evidenciado na literatura, esses microrganismos Gram positivos podem formar estruturas complexas que dificultam a penetração de antimicrobianos e acabam por se mostrar tolerantes aos mesmos, mesmo quando sensíveis a esses compostos *in vitro*. Como também observado, as infecções na medula óssea produzidas por actinomicetos não apresentaram sintomatologia dolorosa proeminente e histologicamente observava-se um infiltrado inflamatório crônico.

Embora a maioria dos microrganismos detectados nas secreções ou seqüestros ósseos removidos seja constituída de microrganismos bucais, os mesmos foram obtidos por punção e isolados em grandes números, sendo que tal fato

reforça a sugestão de que participavam da patogênese da lesão e não simples contaminantes que adentraram a lesão medular a partir de fistulas.

Algumas das espécies bacterianas detectadas, por cultura e/ou por PCR, apresentam notável capacidade proteolítica, como os anaeróbios *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis*, e estabelecem relações ecológicas com numerosas outras espécies, como as fusobactérias bucais, detectadas em 50% dos casos analisados, e também são causa freqüente de infecções orofaciais agudas e crônicas, além de relação com condições septicêmicas graves ou bacteremias (Takai et al., 2005). A participação desses microrganismos no processo de doença constitui fato importante que colabora na compreensão dos benefícios representados pelo uso do oxigênio hiperbárico, que além de estimular a angiogênese ao redor do osso com vitalidade, auxilia o metabolismo celular dos leucócitos, exacerbaria a produção de proteínas nos tecidos adjacentes e atuaria diretamente sobre o metabolismo desses microrganismos reduzindo ou prevenindo a invasão tecidual (Lentrod et al., 2007).

A despeito da grande significância da microbiota bucal nas infecções ósseas descritas (Scolozzi et al., 2005), a tabela 2 evidencia a participação de microrganismos entéricos, como *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, e *Proteus vulgaris*, normalmente ligados a infecções multirresistentes, infecções nosocomiais, pacientes imunocomprometidos (Sixou, 2003) e em osteomileites crônicas (Scolozzi et al., 2005). Nesse sentido, quatro dos cinco pacientes que albergavam esses microrganismos em suas lesões apresentavam histórico de uso de antimicrobianos por indicação profissional ou por automedicação e também apresentaram microrganismos do gênero *Actinomyces* na microbiota das lesões. Nos casos em que se observou a presença de microrganismos entéricos, nenhum dado

clínico sugeriu que os pacientes possuíam problemas neurológicos que colaborasse para a auto-inoculação desses microrganismos, como aventado por Scolozzi et al. (2005), ou sistêmicos que permitissem a implantação dessas bactérias.

Em contraste à detecção histológica ou detecção de bactéria por cultura, a detecção de microrganismos a nível de método biológico molecular como PCR necessita consideravelmente de menores amostras desses patógenos. Em síntese, é mostrado neste estudo que em pacientes com osteomielite crônica dos maxilares, *Actinomyces* e anaeróbicos orais são consideravelmente frequentes, porém, dados adicionais necessitam estabelecer uma melhor relação entre esses microrganismos e o desenvolvimento de osteomielite crônica, processos inflamatórios não cicatrizantes e purulentos, conhecidos como características da osteomielite crônica.

CONCLUSÃO

Conclusão

- Os dados desse estudo indicam que a principal fonte de infecção presente nos casos de osteomielite crônica dos maxilares é representada pela microbiota subgingival (infecções mistas anaeróbias);
- A associação de cultura e PCR devem ser consideradas na determinação da etiologia dessas infecções;
- Os gêneros *Fusobacterium* e *Parvimonas* são os mais frequentes nesses processos infecciosos.

REFERÊNCIAS

Referências

- Al-Haroni, M.; Skaug, N.; Bakken, V. & Cash, P. Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 23: 36-42, 2008.
- Avila-Campos, M. J.; Rivera, I.; Nakano, V. Genetic diversity of oral *Fusobacterium nucleatum* isolated from patients with different clinical conditions. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 48, n. 2, p. 59-63, 2006.
- Baltensperger M, Grätz K, Bruder E, Lebeda R, Makek M, Eyrich G. Is primary chronic osteomyelitis a uniform disease? Proposal of a classification based on a retrospective analysis of patients treated in the past 30 years. *J Cran-Maxillofac Surg*; 32:43-50, 2004
- Betts, N. J.; Abaza, N. A. & Kazemi, A. An expansile bony lesion of the posterior mandible in a 12, year-old girl. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 54: 203-9, 1996.
- Brady B.A., Leid J.G, Costerton J.W., Shirliff ME. Osteomyelitis: clinical overview and mechanisms of infection persistence. *Clin. Microbiol. Newsletter*, v. 28, n. 9, p. 65-72, 2006.
- Breitkopf C; Hammel D; Scheld HH; Peters G; Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation*; 111(11)1415-21, 2005
- Brook, I. Actinomycosis: diagnosis and management. *Southern Med. J.*, 101:1019-23, 2008a.

- Brook, I. Anaerobic osteomyelitis in children. *Pediatr. Infect. Dis.*, 5: 550-6, 1986.
- Brook, I. Microbiology and management of joint and bone infections due to anaerobic bacteria. *J. Orthop. Sci*, 13: 160-9, 2008b.
- Coviello, V. & Stevens, M. R. Contemporary concepts in the treatment of chronic osteomyelitis. *Oral Maxillofacial. Surg. Clin. North Amer.*, 19: 523-34, 2007.
- Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n. 3, p. 1018-1028, 2006.
- Gaetti-Jardim, E. Jr.; Landucci, L. F.; Lins, S. A.; Vieira, E. M. & Oliveira, S. R. Susceptibility of strict and facultative anaerobes isolated from endodontic infection to metronidazole and beta-lactams. *J. Appl. Oral Sci.*, 15: 539-45, 2007.
- Gomes B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 19, p. 71-6. 2004.
- Gutierrez, K. Bone and joint infections in children. *Pediatr. Clin. North Amer.*, 52: 779-94, 2005
- Handal, T.; Olsen, I.; Walker, C. B.; & Caugant, D. A. β -Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 19: 303-8, 2004.

- Hansen T, Kunkel M, Kirkpatrick CJ, Weber A. *Actinomyces* in infected osteoradionecrosis—underestimated. *Human Pathology*; 37: 61-67, 2006
- Jervoe-Strom P-M. Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planing as monitored by real-time PCR. *J. Clin. Periodontol.*, v. 34, p. 156-63, 2007.
- Kim, S-G. & Jang, H-S. Treatment of chronic osteomyelitis in Korea. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 92: 394-8, 2001.
- Le Moal, G.; Juhel, L.; Grollier, G.; Godet, C.; Azais, I. & Roblot, F. Vertebral osteomyelitis due to *Fusobacterium* species: report of three cases and review of the literature. *J. Infect.*, 51: e5-e9, 2005.
- Lentrod S., Lentrodt J., Kübler N, Mödder U. Hyperbaric oxygen for adjuvant therapy for chronically recurrent mandibular osteomyelitis in childhood and adolescence. *J Oral Maxillofac Surg* 65:186-191, 2007.
- Lew DP, Waldvogel FA .Osteomyelitis. *Lancet*; 364: 369-79, 2004
- Mader JT, Shirtliff ME, Bergquist S, Calhoun J. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v. 360, p. 47-65, 1999.
- Mandracchia, V. J.; Sandres, S. M.; Jaeger, A. J. & Nickles, W. A. Management of osteomyelitis. *Clin. Pediatr. Med. Surg.*, 21: 335-51, 2004.
- Möller, A. J. Microbiol examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. *Odontol. Tidskr.* v. 74, (Suppl, p. 1-138), 1966.

- O'Sullivan, D.; King, P. & Jagger, D. Osteomyelitis and pathological mandibular fracture related to a late implant failure: a clinical report. *J. Prosthet. Dent.*, 9:106-10, 2006.
- Prasad, K. C.; Prasad, S. C.; Mouli, N. & Agarwal, S. Osteomyelitis in the head and neck. *Acta Oto-Laryngol.*, 127: 194-205, 2007.
- Rush DE, Abdel-Haq N, Zhu J-Fu, Amar B, Malian M. Clindamycin versus unasyn in the treatment of facial cellulites of odontogenic origin in children. *Clin. Pediatrics*, v. 46, n. 2, p. 154-159, 2007.
- Scolozzi P, Lombardi T, Edney T, Jaques B. Enteric bacteria mandibular osteomyelitis. *Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.99, p. 42-6, 2005.
- Sharkawy, A. A. Cervicofacial actinomycosis and mandibular osteomyelitis. *Infect. Dis. Clin. North Amer.*, 21: 543-56, 2007.
- Sixou, M. (2003). Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis.* 9 (suppl. 1), 54-62.
- Takai S, Kuriyama T, Yanagisawa M, Nakagawa K, Karasawa, T. Incidence and bacteriology of bacteremia associated with various oral and maxillofacial surgical procedures. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.99, p. 292-8, 2005.
- Van Driessche K, Van Ranst D, Van Offel J, et al. Actinomycosis as a rare cause of vertebral osteolysis. *Acta Clin Belg*; 58: 296 – 8, 2003
- Van Merkesteyn JP; Groot RH; van der Akker HP; Bakker DJ; Borgmeijer-

Hoelen AM. Treatment of chronic suppurative osteomyelitis of the mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg*;26(60):450-4, 1997.

Yamaura M, Sato T, Echigo S, takahashi N. Quantification and detection of bacteria from postoperative maxillary cyst by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 20, n. 6, p. 333-8, 2005.

Yeoh SC, MacMahon S, Schifter M. Chronic suppurative osteomyelitis of the mandible: case report. *Aust Dent J*; 50:(3):200-203, 2005

Zuluaga AF; Galvis W; Saldarriaga JC; Agudelo M; Salazar BE Vesga O. Etiologic diagnosis of chronic osteomyelitis: a prospective study. *Arch Intern Med*; 166(1): 95-100, 2006.

ANEXOS

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JOSÉ DE SEVERINA FILHO"
Campus de Araraquã



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Microbiota associada à colonização da amola e modificações nos perfis microbianos associados", sob a responsabilidade de Elton Cristiano Costa Jardim, com o nº de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa e foi aprovado em 28/04/19, de acordo com o Parecer 000.19.00007/19.

Araraquã, 28 de abril de 2019.



Responsável pelo Comitê de Ética em Pesquisa
Araraquã, 28 de abril de 2019

Tabela 1. História clínica – dados de pacientes com osteomielites.

Características	N (%)
História de consumo de tabaco	
Sim	13 (59.1)
Não	9 (40.9)
História de consume de álcool	
Sim	8 (46.4)
Não	14 (63.6)
Fatores predisponentes	
Gengivites	8 (36.4)
Periodontite lateral	13 (59.1)
Periodontite apical	3 (13.6)
Extração dental	4 (18.2)
Período de evolução	
8 a 12 semanas	7 (31.8)
13 a 30 semanas	11 (50.0)
Acima de 31 semanas	4 (18.8)
Região anatômica afetada por osteomielite	
Corpo mandibular esquerdo	6 (27.3)
Corpo mandibular direito	8 (36.4)
Região mentoniana	3 (13.6)
Maxilar posterior	5 (22.7)
Principal sintomatologia das osteomielites	
Sequestro ósseo	10 (45.5)
Pus intraoral	5 (22.7)
Fístula extraoral	1 (4.5)
Dores ósseas prolongadas	8 (36.4)
Eritema	1 (4.5)
Espessamento periosteal e irregularidades ósseas	7 (31.8)
Alterações radiográficas sugerindo lesões osteolíticas e áreas de condensação óssea	16 (72.7)

Tabela 2. Microrganismos cultivados de 22 casos de osteomielites crônicas dos maxilares.

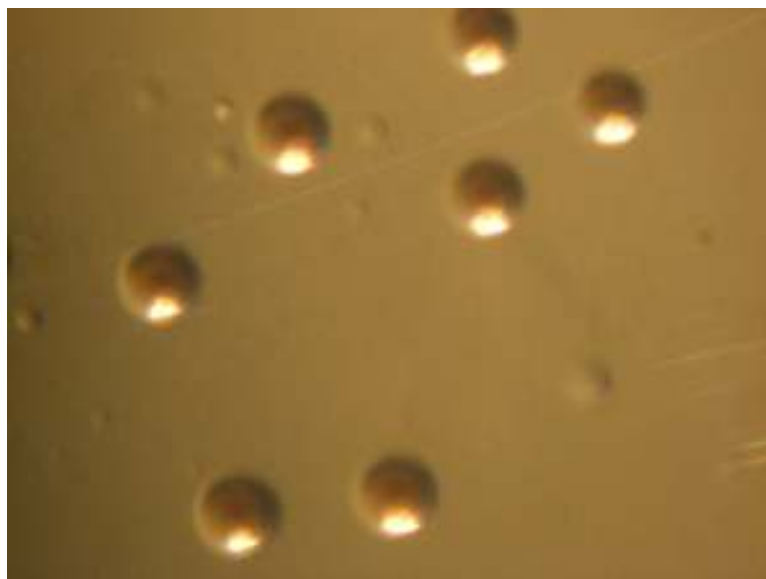
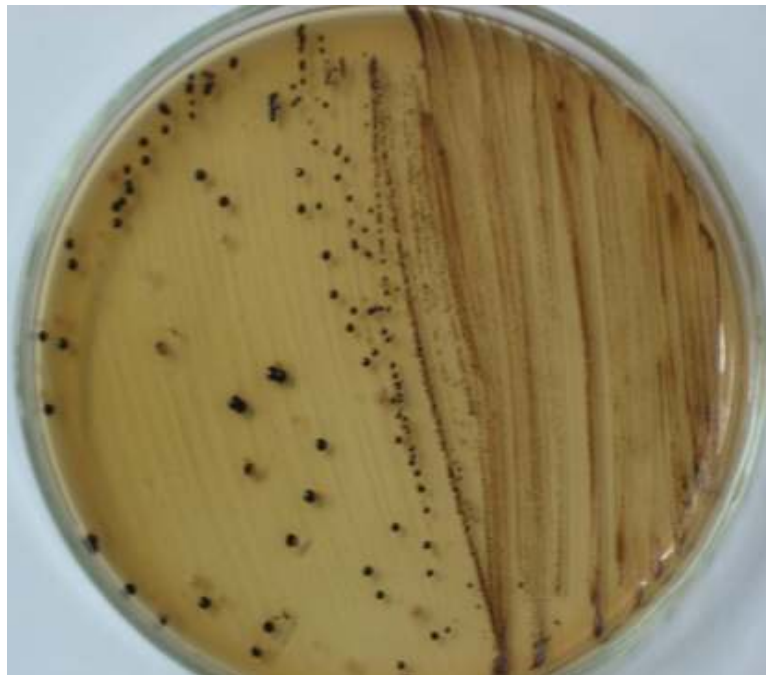
Microrganismo	Prevalência N (%)
<i>Actinomyces israelii</i>	3 (13.6)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3 (13.6)
<i>Actinomyces viscosus</i>	1 (4.5)
<i>Campylobacter rectus</i>	3 (13.6)
<i>Eikenella corrodens</i>	1 (4.5)
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (4.5)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (4.5)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5 (22.7)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4 (18.2)
<i>Prevotella intermedia</i>	2 (9.1)
<i>Prevotella nigrescens</i>	2 (9.1)
<i>Propionibacterium acnes</i>	1 (4.5)
<i>Parvimonas micra</i>	6 (27.3)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (9.1)
<i>Providencia</i> sp.	1 (4.5)
<i>Staphylococcus</i> sp.	3 (13.6)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (22.7)
<i>Streptococcus oralis</i>	2 (9.1)
Total bactérias	12 (54.5)
Infecções monomicrobianas	3 (13.6)
Infecções mistas	9 (40.9)

Tabela 3. Microrganismos detectados por PCR de 22 casos de osteomielites crônicas dos maxilares.

Microrganismos	Prevalência N(%)
<i>Actinomyces israelii</i>	5 (22.7)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3 (13.6)
<i>Actinomyces viscosus</i>	3 (13.6)
<i>Campylobacter rectus</i>	4 (18.2)
<i>Eikenella corrodens</i>	4 (18.2)
<i>Enterobacteriaceae</i>	6 (27.3)
<i>Enterococcus faecalis</i> .	3 (13.6)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7 (31.8)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4 (18.2)
<i>Prevotella intermedia</i>	4 (18.2)
<i>Prevotella nigrescens</i>	3 (13.6)
<i>Propionibacterium acnes</i>	3 (13.6)
<i>Parvimonas micra</i>	8 (36.4)
<i>Staphylococcus spp.</i>	8 (36.4)
<i>Streptococcus oralis</i>	3 (13.6)
<i>Treponema denticola</i>	1 (4.5)
Total	16 (72.7)
Ausência de DNA bacteriano	6 (27.3)
Infecção monomicrobiana	2 (9.1)
Infecções mistas	14 (63.6)



Dessecadores



Cultura



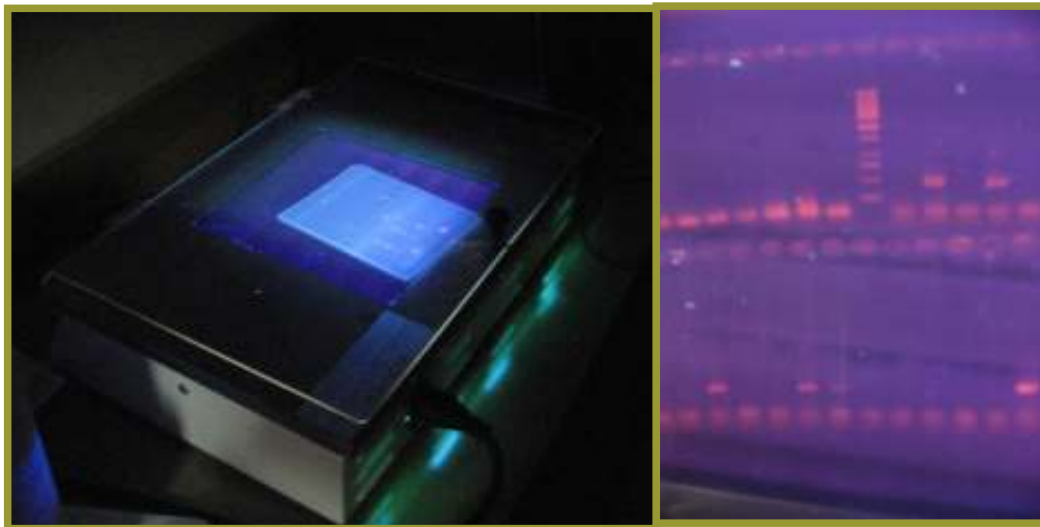
Extração DNA / Qiaamp Mini Kit



Amplificação do DNA



Separação dos Amplicons por Eletroforese



Observação dos amplicons

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](#)