

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

14/12/2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

FELIPE PAIVA MACHADO

**INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIA X SECUNDÁRIA:
perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico,
sinais e sintomas**

FELIPE PAIVA MACHADO

**INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIA X SECUNDÁRIA: perfil microbiano,
níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico, sinais e sintomas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos Clínicos e Laboratoriais de Materiais e Técnicas Endodônticas (Endodontia).

Orientadora: Profa. Tit. Dra. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Machado, Felipe Paiva

Infecções endodônticas primária x secundária: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicóico, sinais e sintomas / Felipe Paiva Machado. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite periapical. 2. Microbiota. 3. Endotoxinas. 4. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 5. Hibridização de ácido nucleico. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Bauru (USP)

Campus de Bauru

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esta formação primeiramente a Deus, pois devo a Ele cada passo que dou e conquista que alcanço, pois sempre sei que está ao meu lado, guiando-me e orientando-me.

À minha mãe, que tanto me ajuda em tudo que pode e muito além. Pelo seu amor incondicional e por sempre acreditar em mim, por incentivar e dar forças onde quer que eu esteja, não me sinto sozinho, pois também sei que ela está rezando e cuidando de mim.

Ao meu pai, que sempre ajuda com seu apoio, orientações e disposição a fazer tudo que pode, a qualquer hora e lugar. Por possibilitar com seu auxílio tudo que tenho me proposto a fazer. Como é bonito o orgulho que tem a cada passo que dou.

À minha irmã e ao meu cunhado, por estarem sempre comigo. À minha irmã por todo seu amor e ao meu cunhado, que se tornou um irmão. Vocês que me deram um dos maiores presentes, minha sobrinha e afilhada Bianca, que tanto amo.

A vocês, minha família, dedico mais esta nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera, por ter acreditado em mim ao me aprovar na sua equipe durante essa caminhada de aprendizado e crescimento pessoal e profissional que foi o mestrado. Por todos seus ensinamentos, desde a graduação, no meu primeiro contato com a Endodontia, até aprofundamentos clínicos, pedagógicos, pessoais e profissionais compartilhando suas experiências e conhecimentos, incentivando sempre a ir além, buscar ser melhor e crescer cada vez mais, valorizando e ensinando o que é ser um mestre e o valor de sempre ter a ciência como base.

Agradeço ao professor Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho que sempre esteve presente durante todo o Mestrado, tanto nos créditos quanto nas clínicas, destacando-se o CETRADE, no qual sempre me auxiliou. Fico feliz por ter sido minha banca no Exame Geral de Qualificação e agora estar novamente na minha defesa, contribuindo para a minha formação e o meu trabalho, acompanhando-me em mais este momento.

Agradeço a toda equipe da especialização em Endodontia da FUNBEO – FOB – USP, que me recebeu com muito carinho e companheirismo, compartilhando seus conhecimentos e sendo fundamental para ampliar meus saberes na Endodontia. Em especial, à professora Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, que foi minha orientadora durante a especialização, sempre compartilhando suas histórias, experiências e conhecimentos durante as aulas e clínicas com dedicação, acolhimento e amizade. Foi uma época especial de crescimento pessoal e profissional, na qual conheci excelentes professores e amigos de turma que recordarei com felicidade. Estou muito feliz e grato por estar presente na minha defesa de mestrado, colaborando mais uma vez na minha formação.

Aos professores dos créditos e do departamento de Odontologia Restauradora, em especial aos professores da Endodontia.

Agradeço à professora Flávia pelo convívio e ensinamentos e auxílio nas metodologias das pesquisas realizadas.

A todos os colegas do mestrado e doutorado, amigos que fiz, tanto da área de Endodontia, quanto de Dentística, compartilhando e apoiando em muitos momentos desta jornada. Aos que ingressaram comigo, em especial à Thaís, à Laís, ao Ricardo e à Bruna. À Cassia pela amizade e ensinamentos durante todo o mestrado, inclusive na metodologia clínica e laboratorial que me ensinou e compartilhou o que pode, sendo fundamental para a realização deste projeto, sempre disposta a ajudar em tudo. Ao Esteban e à Bruna que fizeram parte da pesquisa clínica, estando sempre presentes e pela colaboração mútua, em um aprendizado em conjunto. À Rayana pela amizade, por ter compartilhado seus conhecimentos e pela ajuda fundamental nesta pesquisa. À Daiana pela disposição e boa vontade em nos ajudar sempre que precisamos e sua colaboração para a realização do *Checkerboard*.

À professora Luana que contribuiu com suas opiniões e estudos no Exame Geral de Qualificação. À Izilvânia da Universidade de Guarulhos que auxiliou e ensinou em relação à realização do *Checkerboard*. Ao professor Rocco, no auxílio da volumetria das lesões. À professora Luciane pela disponibilidade em sempre ajudar, pelo estágio na disciplina de Terapêutica e a ela e ao Felipe pelo auxílio na realização do teste de LTA. Aos professores Sérgio da Radiologia e Mauro da Periodontia e a toda equipe da Propedêutica, em especial à professora Janete; à triagem, em especial à Marcia e às técnicas Fernanda e Josiana pela contribuição na triagem e agendamentos dos pacientes.

Aos pacientes, fundamentais na pesquisa e que bem receberam e colaboraram com nosso atendimento e intervenção e às alunas de iniciação científica Karina, Daniele, Karollyne, Daniela e Beatriz pela colaboração no projeto.

Aos apoios do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/Brasil, pela bolsa durante o mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processos n. 2015/05397-1 e n. 2018/01703-9) pelo auxílio à minha orientadora viabilizando esta trajetória.

Enfim a todos que se envolveram e torceram por mim direta ou indiretamente no percurso do curso de mestrado e na realização da minha dissertação, em especial aos meus familiares, às minhas amigas e as novas que surgiram.

Muito obrigado!

"A sabedoria começa na reflexão". Sócrates

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Relação da microbiota das infecções endodônticas primária e secundária com sinais e sintomas	15
2.2 Endotoxinas	18
2.3 Ácido lipoteicóico.....	21
2.4 Radiografias periapicais x Tomografias computadorizadas de feixe cônico na destruição óssea periapical	23
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Seleção de paciente	29
4.2 Seleção dos casos e análise de sinais e sintomas clínicos	30
4.2.1 Infecção endodôntica primária.....	30
4.2.2 Infecção endodôntica secundária.....	31
4.2.3 Análise de sinais e sintomas clínicos.....	31
4.3 Intervenção odontológica.....	32
4.4 Coletas do canal radicular	33
4.5 Carga microbiana (UFC/mL)	34
4.6 Análise por <i>Checkerboard</i>	37
4.6.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento	37
4.6.2 Isolamento do DNA e preparo das sondas.....	38
4.6.3 <i>Checkerboard DNA –DNA hybridization</i>	40
4.7 Quantificação de Endotoxinas (EU/mL).....	42
4.8 Detecção e quantificação de ácido lipoteicóico (ELISA).....	44
4.9 Análise da volumetria da destruição óssea periapical (mm ³).....	45
4.10 Análise estatística	49
5 RESULTADO	50
5.1 Cultura microbiológica.....	50
5.2 <i>Checkerboard DNA-DNA hybridization</i>	50

5.3 Quantificação dos níveis dos fatores de virulência – LPS e LTA.....	54
5.4 Análise por Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico: Volume da lesão periapical.....	55
5.5 Associação de endotoxinas e ácido lipoteicóico com sinais e sintomas clínicos e volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária.....	55
5.6 Associação de micro-organismos com sinais e sintomas clínicos e o volume da lesão periapical em dentes com infecções endodônticas primária e secundária.....	58
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67
APÊNDICES.....	76
ANEXO.....	84

Machado FP. Infecções endodônticas primária x secundária: perfil microbiano, níveis de endotoxinas e ácido lipoteicoico, sinais e sintomas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Esta pesquisa clínica teve como objetivo comparar a carga e composição microbiana bem como as concentrações de LPS e LTA encontradas na infecção endodôntica primária (IEP) e na infecção endodôntica secundária (IES). Além disso, a correlação desses achados com características clínicas e tomográficas também foram investigadas. Sessenta dentes de pacientes com IEP (31) e IES (29) foram submetidos à avaliação clínica e tomográfica, seguido do tratamento endodôntico ou retratamento. Amostras foram coletadas de cada canal radicular utilizando cones de papel. Logo após a abertura coronária (IEP) ou após a desobturação dos canais (IES) o conteúdo coletado foi submetido à técnica de cultura microbiológica para determinar a carga microbiana de bactérias anaeróbias e ao método *Checkerboard DNA-DNA hybridization* para investigação de espécies bacterianas presentes. O teste de Lisado de Amebócito de Limulus e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática foram utilizados para quantificar os níveis de LPS e LTA. Os dados obtidos foram correlacionados com os achados clínicos e tomográficos. Maiores quantidades de bactérias cultiváveis e de LPS foram encontradas na IEP ($p < 0,05$). Não houve diferença nos níveis de LTA entre IEP e IES ($p > 0,05$). A mediana de espécies por canal radicular encontrada na IEP foi de 9 espécies e na IES foi de 22 ($p < 0,05$). As espécies bacterianas mais prevalentes detectadas na IEP foram *P. gingivalis* (14/31) e *S. intermedius* (14/31). Na IES, as espécies mais prevalentes foram *P. gingivalis* (21/29) e *C. rectus* (20/29). LPS foi correlacionado positivamente com um maior volume da lesão periapical ($p < 0,05$). Níveis de LTA não foram relacionados a sinais e sintomas ou ao volume da lesão periapical ($p > 0,05$). Concluiu-se que dentes com IEP tiveram maiores quantidades de carga microbiana e de LPS do que os dentes com IES. Uma maior quantidade de LPS foi correlacionada positivamente com um maior volume de destruição óssea periapical. Uma ampla interação de espécies bacterianas específicas resultou em diferentes características clínicas.

Palavras-chave: Periodontite periapical. Microbiota. Endotoxinas. Ensaio de imunoabsorção enzimática. Hibridização de ácido nucleico.

Machado FP. Primary x secondary endodontic infections: microbial profile, endotoxins and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

*This clinical research aimed to compare the microbial load and composition as well as the LPS and LTA concentrations found in Primary Endodontic Infection (PEI) and Secondary Endodontic Infection (SEI). In addition, the correlation of these findings with clinical and tomographic features was also investigated. Sixty patients' teeth with PEI (31) and SEI (29) were submitted to clinical and tomographic assessment, followed by endodontic treatment or retreatment. Samples were taken from each root canal using paper points. After the coronary opening (PEI) or after the removal of root filling material (SEI), the collected samples were submitted to the microbiological culture technique to determine the microbial load of anaerobic bacteria and to the Checkerboard DNA-DNA hybridization method for investigation of present bacterial species. The Limulus amoebocyte lysate assay and enzyme-linked immunosorbent assay were used to quantify LPS and LTA levels. The data obtained were correlated with clinical and tomographic findings. A higher number of cultivable bacteria and LPS was found in PEI ($p < 0.05$). There was no difference in LTA levels between PEI and SEI ($p > 0.05$). The median number of species per root canal found in PEI was 9 and 22 in SEI ($p < 0.05$). The most prevalent bacterial species detected in PEI were *P. gingivalis* (14/31) and *S. intermedius* (14/31). In SEI, the most prevalent species were *P. gingivalis* (21/29) and *C. rectus* (20/29). LPS was positively correlated with a larger periapical lesion volume ($P < 0.05$). LTA levels were not related to signs and symptoms or periapical lesion volume ($p > 0.05$). It was concluded teeth with PEI had higher contents of microbial load and LPS than teeth with SEI. However, a more diverse microbiota was found in SEI than that of PEI. Higher content of LPS was positively correlated with larger periapical bone destruction. A widely interaction of specific microbial species resulted in different clinical features.*

Keywords: *Periapical periodontitis. Microbiota. Endotoxins. Enzyme-linked Immunosorbent assay. Nucleic acid hybridization.*

1 INTRODUÇÃO

As infecções endodônticas são compostas por micro-organismos que se proliferam e se perpetuam nos sistemas de canais radiculares, como consequência de necrose pulpar, decorrente de traumatismo do elemento dental, presença de lesões cariosas ou restaurações defeituosas (Kirkevang et al., 2007). Os micro-organismos e seus produtos, a exemplo dos lipopolissacarídeos e o ácido lipoteicóico, representam importante papel no estabelecimento e desenvolvimento da lesão periapical (Takehashi et al., 1965), sendo, portanto, de grande importância conhecer seus efeitos no organismo. Sendo assim, o tratamento endodôntico tem como objetivo a eliminação dos micro-organismos e seus produtos causadores da resposta inflamatória periapical.

A periodontite apical é uma doença inflamatória que afeta os tecidos adjacentes ao ápice radicular como consequência de uma infecção presente no sistema de canais radiculares (Montagner et al., 2010; Martinho et al., 2014). A infecção endodôntica primária tem caráter polimicrobiano, com presença de micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos (Gomes et al., 1996; Rôças et al., 2003, 2010; Siqueira et al., 2003; Montagner et al., 2010). Esta infecção é inicialmente causada por micro-organismos que colonizam o tecido pulpar necrosado, sendo que a microbiota envolvida pode variar de acordo com o tempo de infecção (Siqueira et al., 2010).

As bactérias Gram-negativas, durante sua morte ou multiplicação, liberam produtos, os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa das mesmas, sendo que sua liberação causa efeitos biológicos como a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Hong et al., 2004; Tang et al., 2011), as quais levam à reação inflamatória e reabsorção óssea periapical (Yamasaki et al., 1992). Os altos níveis de LPS estão associados com o desenvolvimento de dor espontânea (Horiba et al., 1991; Khabbaz et al., 2001; Jacinto et al., 2005; Cardoso et al., 2015), dor à palpação (Jacinto et al., 2005) e dor à percussão (Gomes et al., 2009).

Com o intuito de eliminar os micro-organismos e seus produtos, o tratamento endodôntico é muito importante durante todas as suas etapas. Estas incluem desde a remoção de tecido cariado e restaurações extensas, até a eliminação bacteriana

pela irrigação e instrumentação dos canais radiculares e aplicação de medicação intracanal, seguida do preenchimento hermético do canal radicular por materiais obturadores e da realização do procedimento restaurador (Mohamed et al., 2017), desempenhando papel fundamental.

Entretanto, as condições patológicas podem permanecer mesmo após a conclusão do tratamento endodôntico, havendo a necessidade da realização de uma reintervenção (Carrote, 2005; Eliyas et al., 2014). Isso se deve a possíveis falhas na desinfecção do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico ou falhas técnicas de instrumentação e obturação incompleta do canal radicular deixando espaços na região apical, favorecendo a permanência de restos necróticos e bactérias no sistema de canais radiculares (Dahlén, Möller, 1992) ou ainda sua recontaminação pela ausência de um correto selamento coronário (Peciulienė et al., 2006; Estrela et al., 2008a).

Estudos mostram que a microbiota da infecção endodôntica secundária difere da encontrada na infecção endodôntica primária, apresentando reduzida diversidade, dada à predominância de espécies anaeróbias facultativas Gram-positivas (Siqueira, 2001; Pinheiro et al., 2003; Adib et al., 2004; Gomes et al., 2004), como *Enterococcus faecalis*, podendo inclusive ocorrer casos de monoinfecção (Hancock et al., 2001; Rôças et al., 2004). *E. faecalis* é considerado um dos micro-organismos mais prevalentes na infecção endodôntica secundária, atingindo frequências de até 90% dos casos (Molander et al., 1998; Pinheiro et al., 2003; Rôças et al., 2004). Além disso, é nove vezes mais comum em canais tratados do que não tratados (Rôças et al., 2004), o que sugere que pode ser inibido por outros membros da comunidade microbiana mista comumente encontrados em infecções primárias, e que condições ambientais menos propícias em um canal tratado não impedem sua sobrevivência (Siqueira et al., 2010).

Como produto de *E. faecalis* e de outras bactérias Gram-positivas, o ácido lipoteicóico (LTA) é um importante fator de virulência, participando do desenvolvimento e permanência da patologia periapical (Ginsburg, 2002; Costa et al., 2003). Estudos sobre o LTA (Knox, 1973; Hausmann et al., 1975; Hummell et al., 1985; Keller et al., 1992) demonstraram alterações nos tecidos, como a reabsorção óssea (Hausmann et al., 1975), a ativação das vias do sistema complemento (Loos et al., 1986; Hummell et al., 1985) e liberação de citocinas pró-inflamatórias;

regulação de angiogênese; liberação de hidrolases, proteases e das espécies reativas de oxigênio de neutrófilos e macrófagos; além da regulação, recrutamento e ativação de neutrófilos (Ryu et al., 2009).

A diminuição da densidade óssea causada pelos produtos bacterianos decorrentes da infecção endodôntica é identificada no exame radiográfico como uma área radiolúcida ao redor do ápice radicular (Bender, 1997). Entretanto, estudos confirmaram que a radiografia periapical é limitada ao se detectar a radiolucência periapical (Bender, 1997; Paula-Silva et al., 2009), uma vez que há sobreposição de tecidos e baixa eficácia do método ao se avaliar a profundidade de uma lesão periapical (Stavropoulos, Wenzel, 2007; Low et al., 2008; Bornstein et al., 2011; Tsai et al., 2012). Desta forma, a reconstrução da imagem em três dimensões se tornou possível e atualmente tem sido utilizada na endodontia, através do advento da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC).

A TCFC é capaz de fornecer representações tridimensionais de alta qualidade e precisão dos elementos ósseos do esqueleto maxilofacial. Os sistemas de TCFC disponíveis fornecem pequenas imagens de campo de visão em baixa dose com resolução espacial suficiente para aplicações em diagnóstico endodôntico, orientação de tratamento e avaliação pós-tratamento. A TCFC beneficia a endodontia, tornando possível demonstrar características anatômicas que as imagens intraorais, panorâmicas e cefalométricas não são capazes de fornecer, sendo capaz de avaliar no sentido vestibulo-lingual a real destruição óssea. Além disso, devido à reconstrução dos dados da TCFC ser realizada utilizando um computador, os dados podem ser reorientados em suas verdadeiras relações espaciais (Scarfe et al., 2009), sendo que estudos, como de Cardoso et al. (2015), já têm utilizado a TCFC para avaliar a presença e o volume da lesão periapical, correlacionando este volume com presença de micro-organismos e seus produtos.

Levando em consideração o tema abordado, há na literatura maior número de trabalhos que avaliam a infecção endodôntica em relação à carga microbiana, à quantificação de LPS e sinais e sintomas (Gomes et al., 2004; Blome et al., 2008; Gomes et al., 2012; Tennert et al., 2013; Leite et al., 2015; Lysakowska et al., 2016; Pandey et al., 2016; Keskin et al., 2017). Porém, pouco se tem avaliado os níveis de LTA, importante fator de virulência de bactérias Gram-positivas. Sabe-se ainda que as infecções endodônticas primária e secundária diferem entre si quanto à

microbiota predominante, podendo levar a variações nos níveis dos subprodutos dos micro-organismos presentes.

Entretanto, até o presente momento, tais análises não foram relacionadas em conjunto com os níveis de LTA e o volume inicial das lesões periapicais a fim de criar uma comparação de todos estes fatores (carga microbiana, identificação microbiológica de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, níveis de endotoxinas e LTA, sinais e sintomas e volume da lesão periapical) em um único estudo clínico para um conhecimento mais abrangente e correlacionado. Sendo assim, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre o tema, trazendo uma significativa contribuição para a área de endodontia, uma vez que para melhorar e/ou buscar melhores estratégias de tratamento, é necessário compreender plenamente o perfil microbiológico dos diferentes tipos de infecção endodôntica, bem como sua patogenicidade.

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, pode-se concluir em relação às infecções endodônticas primária e secundária que:

- a) As infecções apresentaram natureza polimicrobiana, com predomínio de bactérias Gram-negativas;
- b) A IEP apresentou maior quantidade de bactérias anaeróbias cultiváveis comparada à IES;
- c) A IES apresentou maior diversidade bacteriana, com maior quantidade de espécies por canal;
- d) As espécies bacterianas mais prevalentes detectadas na IEP foram *P. gingivalis* (14/31) e *S. intermedius* (14/31). Na IES, as espécies mais prevalentes foram *P. gingivalis* (21/29) e *C. rectus* (20/29);
- e) Quanto aos fatores de virulência, maiores quantidades de LPS foram encontradas na IEP e não houve diferença estatística nos níveis de LTA entre IEP e IES;
- f) Não houve diferença no volume da lesão periapical entre IEP e IES, porém maior nível de LPS foi correlacionado com maior volume de destruição óssea periapical e sinais e sintomas na IEP;
- g) Níveis de LTA não foram relacionados a sinais e sintomas ou ao volume da lesão periapical;
- h) Uma ampla interação de espécies bacterianas específicas resultou em diferentes características clínicas.

REFERÊNCIAS*

- Adib V, Spratt D, Ng YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*. 2004 Aug;37(8):542-51.
- Ahn SH, Song JE, Kim S, Cho SH, Lim YK, Kook JK, et al. NOX1/2 activation in human gingival fibroblasts by *Fusobacterium nucleatum* facilitates attachment of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Microbiol*. 2016;198:573–83.
- Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One*. 2012;7:e49576.
- Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1355-1359. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.014. Epub 2008 Sep 16. PubMed PMID: 18928846.
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):552-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.002. PubMed PMID: 27000273.
- Baumgartner J, Siqueira Jr J, Xia T, Róças IN. Geographical Differences in Bacteria Detected in Endodontic Infections Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2004;30:141–4.
- Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endod Top*. 2004;7:35–51.
- Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997 Jan;23(1):5-14.
- Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90. doi: 10.1111/j.1399302X.2008.00440.x. PubMed PMID 18793361.
- Bornstein MM, Lauber R, Sendi P, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam computed tomography in mandibular molars for analysis of anatomical landmarks before apical surgery. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):151-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.014.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J.* 2016 Jul-Aug;27(4):412-8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PubMed PMID: 27652703.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR Jr, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod.* 2015 Jul;41(7):1015-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. Epub 2015 Apr 30. PubMed PMID: 25935504.

Carrotte P. Surgical endodontics. *Br Dent J.* 2005 Jan 22;198(2):71-9. PubMed PMID: 15702099.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGDR, Alves MC, Carvalho CAT, Valera MC. Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Microbiological Profile in Primary Endodontic Infections Using 3 Different Instrumentation Systems: A Randomized Clinical Study. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1237-1245. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. Epub 2017 Jun 9. PubMed PMID: 28606669.

Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy SC, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in necrotic teeth root canals by culture and polymerase chain reaction methods. *Eur J Dent.* 2007;1:216–21.

Costa ED, de Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dent J.* 2003;14(2):95-8. PubMed PMID: 12964651.

Dahlén G, Möler AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, editors. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Saint Luis, Mo, USA: Mosby Year Book; 1992. p. 444-75.

Eliyas S, Vere J, Ali Z, Harris I. Micro-surgical endodontics. *Br Dent J.* 2014 Feb;216(4):169-77. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.142. PubMed PMID: 24557386.

Enersen M, Nakano K, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Oral Microbiol.* 2013;5:20265.

Estrela C, Bueno MR, Azevedo BC, Azevedo JR, Pécora JD. A new periapical index based on cone beam computed tomography. *J Endod.* 2008a Nov;34(11):1325-31. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.013. Epub 2008 Sep 17.

Estrela C, Bueno MR, De Alencar AH, Mattar R, Valladares Neto J, Azevedo BC, Et al. Method to evaluate inflammatory root resorption by using cone beam computed tomography. *J Endod.* 2009 Nov;35(11):1491-7. doi: 10.1016/j.joen.2009.08.009. PubMed PMID: 19840636.

Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic and periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod*. 2008b Mar;34(3):273-9. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.023. Epub 2008 Jan 31. PubMed PMID: 18291274.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983 Jul;132(1):6-13.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FG, Nascimento GG, Carvalho CA, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015 Jun;41(6):824-30. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031. Epub 2015 Apr 17. PubMed PMID: 25892513.

Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immun*. 2001;69:751-7.

Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:171-9.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994;27:291-8.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod*. 2012 Aug;38(8):1082-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.021. PubMed PMID: 22794210.

Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J*. 1996; 29:69-75.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6. PubMed PMID: 14871344.

Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *J Endod*. 2008;34:537-40.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102:247-53.

Gomes BPFA, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod*. 2009;35:1350-3.

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 May;91(5):579-86. PubMed PMID: 11346739.

Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:794–801.

Hausmann E, Lüderitz O, Knox K, Weinfeld N. Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. *J Dent Res.* 1975;54(Special issue B):B94-B99.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar;33(3):162-9.

Hong SW, Baik JE, Kang SS, Kum KY, Yun CH, Han SH. Sodium Hypochlorite Inactivates Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* by Deacylation. *J Endod.* 2016 Oct;42(10):1503-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.018. Epub 2016 Aug 9. PubMed PMID: 27520407.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin & clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Apr;71(4):492-5.

Hummell DS, Swift AJ, Tomasz A, Winkelstein JA. Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal lipoteichoic acid. *Infect Immun.* 1985;47:384-387.

Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic & asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005 Aug;54(Pt 8):777-83.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340-9.

Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1992;60:3664-3672.

Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE. Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1309-1316. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.019. Epub 2017 Jun. PubMed PMID: 28648489.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May;91(5):587-93.

Kirkevang LL, Vaeth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A. Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *Int Endod J*. 2007 Apr;40(4):290-9. Epub 2007 Feb 1.

Knox KW, Wicken AJ. Immunobiological properties of teichoic acids. *Bacter Rev* 1973;37:215-257.

Leite FR, Nascimento GG, Demarco FF, Gomes BP, Pucci CR, Martinho FC. Prevalence of treponema species detected in endodontic infections: systematic review and meta-regression analysis. *J Endod*. 2015 May;41(5):579-87. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.020. Epub 2015 Mar 17. Review. PubMed PMID: 25791076.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:547–58.

Loos M, Clas F, Fischer W. Interaction of purified lipoteichoic acid with the classical complement pathway. *Infect Immun* 1986;53:595-599.

Low KM, Dula K, Burgin W, Von Arx T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. *J Endod*. 2008 May;34(5):557–62. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.022.

Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokolowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*. 2016 May;49(5):422-30. doi: 10.1111/iej.12469. Epub 2015 Jun. PubMed PMID: 26011084.

Martinho FC, de Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Dent*. 2017 Jul-Sep;11(3):398-406. doi: 10.4103/ejd.ejd_84_17. Review. PubMed PMID: 28932155; PubMed Central PMCID: PMC5594974.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2095-102.

Mohamed A, Steier L. Uncertain Decision-Making in Primary Root Canal Treatment. *J Evid Based Dent Pract*. 2017 Sep;17(3):205-215. doi: 10.1016/j.jebdp.2017.01.001. Epub 2017 Jan 28. Review. PubMed PMID: 28865817.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31:1-7.

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966 Dec;74(5):Suppl:1-380.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1796-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.008. PubMed PMID: 20951290.

Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T. Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations. *Infect Immun.* 2002;70:938–44.

Mörmann M, Thederan M, Nackchbandi I, Giese T, Wagner C, Hänsch GM. Lipopolysaccharides (LPS) induce the differentiation of human monocytes to osteoclasts in a tumour necrosis factor (TNF) α -dependent manner: A link between infection and pathological bone resorption. *Mol Immunol.* 2008;45:3330–7.

Pandey V, Choudhary I, Kumar V, Tripathi P, Misra A, Bagde H. Assessment of Correlation between Clinical Parameters and Pulp Canal Pathogens in Endodontic Pathologies: A Microbiological Study. *J Contemp Dent Pract.* 2016 Aug 1;17(8):654-8. PubMed PMID: 27659083.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Foschi F, Mannocci F. The detection of periapical pathosis using digital periapical radiography and cone beam computed tomography - part 2: a 1-year post-treatment follow-up. *Int Endod J.* 2012a Aug;45(8):711-23. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02076.x. PubMed PMID: 22775142.

Patel S, Wilson R, Dawood A, Mannocci F. The detection of periapical pathosis using periapical radiography and cone beam computed tomography - part 1: pre-operative status. *Int Endod J.* 2012b Aug;45(8):702-10. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01989.x. Epub 2011 Dec 21. PubMed PMID: 22188219.

Paula-Silva FW, Hassan B, Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Wu MK. Outcome of root canal treatment in dogs determined by periapical radiography and conebeam computed tomography scans. *J Endod.* 2009 May;35(5):723-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.023.

Peciuliene V, Rimkuvienė J, Maneliene R, Ivanauskaite D. Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings. *Stomatologija.* 2006;8(4):122-6.

Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol.* 2005;43:6123–5.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36:1-11.

Pourhajibagher M, Bahador A. Diagnostic accuracy of multiplex real-time PCR approaches compared with cultivation -based detection methods: Monitoring the endopathogenic microbiota pre and post photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22:140–6.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):45-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.022. PubMed PMID: 20003934.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):20-6. PubMed PMID: 12656510.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30: 315-20.

Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(1): 127-33.

Scarfe WC, Levin MD, Gane D, Farman AG. Use of cone beam computed tomography in endodontics. *Int J Dent* 2009;2009:634567.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR-based identification of *Treponema maltophilum*, *T. amylovorum*, *T. medium*, and *T. lecithinolyticum* in primary root canal infections. *Arch Oral Biol.* 2002; 48:495–502.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89:744–8.

Siqueira Jr JF, Lopes HP, Elias CN. "Microbiologia Endodôntica." *Endodontia: biologia e técnica.* 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001 Jan;34(1):1-10.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18:267–80.

Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol.* 1989 Mar;4(1):47-51.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):352-62. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00168.x. PubMed PMID: 15491460.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):177-81. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.008. Epub 2013 Dec 10. PubMed PMID: 24461400.

Stavropoulos A, Wensel A. Accuracy of cone beam dental CT, intraoral digital and conventional film radiography for the detection of periapical lesions. An ex vivo study in pig jaws. *Clin Oral Investig*. 2007 Mar;11(1):101-6.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod*. 2006;32:93–8.

Tang Y, Sun F, Li X, Zhou Y, Yin S, Zhou X. *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of *Escherichia coli* lipopolysaccharide *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1653-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.015.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014 May;40(5):670-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.005. Epub 2013 Nov 19. PubMed PMID: 24767562.

Torabinejad M, Rice DD, Maktabi O, Oyoyo U, Abramovitch K. Prevalence and size of periapical radiolucencies using cone-beam computed tomography in teeth without apparent intraoral radiographic lesions: a new periapical index with a clinical recommendation. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):389-394. doi: 10.1016/j.joen.2017.11.015. Epub 2018 Feb 1. PubMed PMID: 29395115.

Tsai P, Torabinejad M, Rice D, Azevedo B. Accuracy of cone-beam computed tomography and periapical radiography in detecting small periapical lesions. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):965–70. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.001.

Venskutonis T, Daugela P, Strazdas M, Juodzbals G. Accuracy of digital radiography and cone beam computed tomography on periapical radiolucency detection in endodontically treated teeth. *J Oral Maxillofac Res*. 2014 Jul 1;5(2):e1. doi: 10.5037/jomr.2014.5201. eCollection 2014 Apr. PubMed PMID: 25089173; PubMed Central PMCID: PMC4115593.

Wu MK, Shemesh H, Wesselink PR. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. *Int Endod J*. 2009 Aug;42(8):656-66. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01600.x. Epub 2009 Jun 22. Review. PubMed PMID: 19548929.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992 Oct;18(10):501-4.

Yang J, Park OJ, Kim J, Baik JE, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic Acid of *Enterococcus faecalis* Inhibits the Differentiation of Macrophages into Osteoclasts. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):570-4. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.012. Epub 2016 Feb 23. PubMed PMID: 26920932.

Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol.* 2011;162:151–8.