Diego Costa Ahern

Susceptibilidade antimicrobiana ao metronidazol de microrganismos isolados de periodontite crônica e agressiva

Araçatuba – SP

2013

Diego Costa Ahern

Susceptibilidade antimicrobiana ao metronidazol de microrganismos isolados de periodontite crônica e agressiva

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Elerson Gaetti-Jardim Jr

Co-orientadora: Ana Cláudia Okamoto

Araçatuba – SP

2013

Agradecimentos

Agradeço a todos os meus amigos, professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba que colaboraram com minha formação e com a elaboração deste Trabalho de Conclusão de Curso, e também agradecer a meus pais e minha família que me apoiaram durante o curso de Odontologia.

Ahern, D. C. **“Susceptibilidade antimicrobiana ao metronidazol de microrganismos isolados de periodontite crônica e agressiva."** 2013. 19 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlia de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade microbiana ao metronidazol de microrganismos isolados de pacientes com periodontite crônica ou agressiva. As amostras foram obtidas de 50 pacientes com periodontite e os microorganismos foram isolados em meios de cultura seletivos e não seletivos e identificados por métodos bioquímicos e testados para susceptibilidade ao metronidazol. Os resultados evidenciaram a susceptibilidade ao metronidazol entre Gram-negativos anaeróbios e alguns susceptibilidade intermediária e resistência entre os Gram-positivos anaeróbios e facultativos.

PALAVRAS-CHAVE: Periodontite; Bactérias; Metronidazol; Testes de Sensibilidade Microbiana.

Ahern, D. C. **"Antimicrobial susceptibility to metronidazole of microorganisms isolated from chronic and aggressive periodontitis."** 2013. 19 f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlia de Mesquita Filho", Araçatuba, 2013.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the microbial susceptibility to metronidazole from microorganisms isolated from patients with chronic or aggressive periodontitis. The samples were obtained from 50 patients with periodontitis and microorganisms were isolated onto selective and nonselective culture media, identified by biochemical methods and tested for susceptibility to metronidazole. The results evidenced the susceptibility to metronidazole among gram-negative anaerobes and some intermediate susceptibility and resistance among Gram-positive anaerobes and facultatives.

KEYWORDS: Periodontitis; Bacteria; Metronidazole; Microbial Sensitivity Tests.

Sumário

Introdução	7
Materiais e métodos	8
Isolamento e identificação microbiana	10
Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	11
Resultados	12
Discussão	12
Conclusão	14
Referências	14
Tabela	18

Introdução

As doenças periodontais representam problemas de saúde graves e afetam todos os grupos étnicos, independentemente de gênero e condições socioeconômicas da população.[1] Elas são o resultado da perda de equilíbrio entre a resposta imunológica e fatores de virulência da microbiota residente.[2] O controle do biofilme oral é um pré-requisito para a manutenção da saúde do periodonto, sendo que a presença de alguns microrganismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos, como os gêneros *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Campylobacter Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Tannerella*, e *Treponema*[1], tem grande relevância no desenvolvimento da destruição dos tecidos de suporte dental e também podem ser relevantes para outras infecções de cabeça e pescoço e mesmo à distância, como as placas ateromatosas nas coronárias.[3,4]

O tratamento dessas enfermidades periodontais depende, quase que exclusivamente, controle do biofilme microbiano[5], mas em alguns pacientes, em função de diversos fatores modificadores, como dependência química, comorbidades, predisposição genética, imunossupressão, idade e outros, as periodontites podem adquirir um perfil mais agressivo, com extensa perda óssea[2,5] de forma que o emprego de antimicrobianos pode ser necessária para controlar a destruição tecidual[5,6], que pode vir associada ou não à necrose tecidual.

Os antimicrobianos e antibióticos sistêmicos ainda podem ser utilizados no tratamento de pacientes incapazes de manter a higiene bucal, pacientes com necessidades especiais (deficientes mentais ou físicos, que sofreram de traumatismo dentário e / ou cirúrgico, e com periodontite refratária, agressiva ou avançada foram

prescritos, mas a maioria desses compostos possui vários efeitos colaterais.[7] Além disso, a utilização generalizada de agentes antimicrobianos contra anaeróbios orais tem sido associada com um aumento significativo da resistência aos antibióticos.[8] Além disso, a maioria dos microrganismos recuperados de sítios periodontais é anaeróbia obrigatória e os testes de cultura e suscetibilidade de anaeróbios não são realizados com frequência no Brasil[9], o que constitui um problema sério, pois os clínicos têm de escolher antimicrobianos usando apenas literatura internacional.

Dentre os antimicrobianos mais amplamente empregados em odontologia, especialmente como coadjuvante do tratamento periodontal, destaca-se o metronidazol, um nitroimidazol particularmente ativo frente a microrganismos produtores das enzimas piruvato-ferredoxina-óxido-redutase e nitrato-redutase, capazes de concentrar a droga no citoplasma bacteriano e ativá-la com a transferência de elétrons para o grupamento nitro do fármaco, que passa a se inserir no ácido desoxirribonucleico microbiano, fragmentando-o.[10]

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade dos microrganismos isolados de periodontite crônica e agressiva ao metronidazol, a droga mais usada no tratamento da periodontite crônica ou agressiva.

Material e Métodos

Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Proc. 2006-01417). A população estudada consistiu-se de

100 pacientes com características clínicas e radiográficas da periodontite crônica e 16 pacientes com periodontite agressiva, avaliados na Faculdade de Odontologia de Araçatuba e clínicas particulares, entre 1993 e 2012, e classificados segundo os critérios de Armitage[2] (2010). A idade dos pacientes variou de 5 a 59 anos (média 40,2 anos). Os pacientes deveriam apresentar boa saúde geral, sem histórico de utilização de antimicrobianos sistêmicos nos 6 meses que precederam a coleta dos espécimes clínicos.

Durante a primeira visita, obteve-se a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido de cada paciente ou seu responsável e procedia-se á realização da anamnese, exame clínico intra e extrabucal dos pacientes e coleta dos espécimes clínicos do biofilme do sulco gengival.

As amostras clínicas foram coletadas de três sítios periodontais não contíguos apresentando a maior profundidade clínica de sondagem e sangramento gengival. A coleta do biofilme foi realizada por meio de cones de papel absorvente estéreis, que foram introduzidos nas bolsas periodontais e lá permaneceram por 30 segundos, sendo, a seguir, transferidos para meio de transporte VMGA III e enviados para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.

Isolamento e identificação microbiana

No laboratório, as amostras de VMGA III foram submetidas a diluições seriadas em base 10, empregando-se, para tanto, o meio de diluição VMG I, para minimizar o contato com o oxigênio atmosférico. Dessas diluições, alíquotas de 0,1ml foram inoculadas, em duplicata, em ágar Fastidious Anaerobe suplementado com extrato de levedura (0,5%), hemina (1 ug / mL), menadiona (5 ug / ml) e sangue desfibrinado de cavalo (5%), além de ágar TSBV. As placas foram incubadas em anaerobiose (90% de N_2 + 10% de CO_2), a 37 º C, por 14 e 3 dias, respectivamente.

Após o isolamento primário e obtenção de cultura pura, os isolados foram identificados segundo suas características morfocelulares, morfocoloniais e bioquímico-fisiológicas, como descrito por Gaetti-Jardim Jr et al.[11] (2012).

Um total de 207 amostras de bactérias anaeróbias obrigatórias ou facultativas foram isoladas e submetidas aos testes de susceptibilidade ao metronidazol.

Foram avaliadas em 23 amostras isoladas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 12 amostras isoladas de *Bacteroides* sp., 15 amostras de *Eubacterium* sp., 3 amostras de *E. lentum*, 4 amostras de *Fusobacterium* sp., 35 amostras de *F. nucleatum*, 7 *F. periodonticum*, 14 amostras de *Parvimonas micra*, 9 *Peptostreptococcus* sp., 4 amostras de *P. anaerobius*, 11 *Porphyromonas* sp., 25 *Porphyromonas gingivalis*, 7 *Prevotella* sp., 20 amostras de *P. intermedia*, 7 amostras de *P. nigrescens*, e 11 amostras de *Veillonella* sp.

Teste de suscetibilidade ao antimicrobiano

As concentrações mínimas inibitórias foram determinadas pelo método de diluição em ágar, empregando-se o ágar Wilkins-Chalgren suplementado com sangue desfibrinado de cavalo (5%), a hemina (1 µg / mL), e menadiona (5 µg / mL). O inóculo bacteriano foi padronizado em 10^5 células / botão e o mesmo foi transferido para as placas de Petri contendo metronidazol, em concentrações crescentes, e para as placas controle (sem droga) utilizando-se o replicador de Steers (Cefar Ltda, São Paulo, Brasil). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de droga que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

O metronidazol foi obtido a partir de Laboratórios Pfizer Ltda (Guarulhos, Brasil). O ponto crítico utilizado para interpretação dos resultados foi de 16 µg / mL, segundo recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute.[12] As placas teste e controle foram incubadas em anaerobiose (90% N_2 + 10% CO_2), a 37 º C, durante 48 horas.

Como controle dos procedimentos laboratoriais, foram utilizadas as cepas de referência *F. nucleatum* ATCC 10953, *F. nucleatum* ATCC 25586, *E. lentum* ATCC 43055, *B. fragilis* ATCC 23745, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, e *E. faecalis* ATCC 29212

Resultados

Não foi verificada qualquer diferença entre os perfis de susceptibilidade dos isolados recuperados de periodontite crônica ou agressiva e os resultados são apresentados, independentemente da origem das amostras clínicas na Tabela 1.

Dos microrganismos testados, a susceptibilidade ao metronidazol foi maior entre os anaeróbios obrigatórios Gram-negativos, como os gêneros *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Prevotella*, enquanto algumas amostras de anaeróbios Gram-positivos apresentaram susceptibilidade intermediária a essa droga, em particular *P. micra* (7,1%). A resistência ao metronidazol foi observada apenas em amostras de *A. actinomycetemcomitans* (17,5%), que totalizaram 1,9% do total de microrganismos submetidos aos testes de susceptibilidade.

Discussão

A eficácia dos antimicrobianos no tratamento de infecções anaeróbias mistas da cabeça e do pescoço é prejudicada pela precariedade dos critérios de seleção de drogas pelos profissionais de saúde, uma vez que a realização de testes de susceptibilidade a microrganismos de cultivo mais exigente, como os anaeróbios obrigatórios, não constitui uma rotina na grande maioria do território brasileiro.[9]

A maioria dos estudos que tratam do surgimento de resistência aos antimicrobianos de bactérias orais foram realizados em países desenvolvidos e pouca informação está disponível sobre a problemática da resistência a drogas nos países do hemisfério sul.[9] Além disso, a resistência antimicrobiana tem se expandido consideravelmente, o que tornou hábitos de prescrição tradicionais crítico na

ausência de exames laboratoriais.[13] Este fato limita a eficácia do tratamento e pode dificultar o estabaeleciemnto de protocolos de utilização de antimicrobianos em odontologia.

Alguns desses microrganismos mais frequentemente resistentes aos antimicrobianos colonizam o biofilme microbiano.[9,14]

Os anaeróbios obrigatórios e facultativos desempenham papel relevante na etiologia dos quadros mais avanaçados ou agressivos das periodontites[1,5] e a utilização sistêmica de agentes antimicrobianos, em particular o metronidazol, pode melhorar a eficiência do tratamento dessas enfermidades infecciosas, quando associada a procedimentos locais e da modificação das normas de higiene oral.[5,6]

Enquanto a resistência a diversos agentes antimicrobianos vem sendo continuamente detectada em microrganismos bucais[15,16], considera-se que a resitência ao metronidazol permance restrita a microrganismos que nunca foram sensiveis a esse agente, como os anaeróbios facultativos.[10] Os resultados apresentados na Tabela 1 estão parcialmente de acordo com essa posição, visto que apenas isolados de *A. actinomycetemcomitans* se mostraram resitentes a esse agente.

Entretanto, não se pode esquecer que alguns isolados de anaeróbios Gram-positivos mostraram-se menos sensíveis a esse agente, como também relatado previamente por Narikawa[10] (1986) e Gaetti-Jardim Jr et al.[9] (2007). A importância dessa menor sensibilidade entre microrganismos Gram-negativos é questionável, uma vez que pouquíssimos dados estão disponíveis sobre a participação desses microrganismos na etiologia e desenvolvimento das periodontites em humanos,

sugerindo que essa droga continuará sendo utilizada, com segurança, na terapia de infecções mistas anaeróbicas, especialmente devido à sua ação sobre anaeróbios obrigatórios Gram-negativos produtores de enzimas capazes de degradar as penicilinas e cefalosporinas.[17]

Conclusão

Os resultados deste estudo evidenciam que a resistência ao metronidazol nos microrganismos isolados em periodontite agressiva e crônica é limitada a alguns anaeróbios facultativos, enquanto uma sensibilidade intermediária possa ser identificada entre microrganismos anaeróbios obrigatórios Gram-positivos.

Referências

1. Braga RRR, Carvalho MAR, Brunã-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN et al. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. Anaerobe. 2010;16:234-239.
2. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. Periodontology 2000. 2010;53:70–88.
3. Gaetti-JardimJr E, Okamoto AC, Melo ME, Schweitzer CM. Opportunistic microorganisms in patients with head and neck trauma. Arch Health Invest. 2013;2(1):16-23.

4. Ramos MMB, Mendonça MR, Pellizzer EP, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E. Associação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas crônicas – reisão de literatura. Arch Health Invest. 2013;2(1):24-31.
5. Cunha RF, Machado AC, Watanabe S, Freire IR, Goiato MC, Gaetti-Jardim Jr E. A combination of clinical and microbiological management of generalized aggressive periodontitis in primary teeth. A case report. International Journal of Paediatric Dentistry. 2012;22(4):310–316.
6. Ahuja A, Baiju CS, Ahuja V. Role of antibiotics in generalized aggressive periodontitis: a review of clinical trials in humans. J Indian Soc Periodontol. 2012; 16(3):317-23.
7. Eick S, Straube A, Guentsch A, Pfister W, Jentsch H. Comparison of real-time polymerase chain reaction and DNA-strip technology in microbiological evaluation of periodontitis treatment. Diag Microbiol Infect Dis. 2011;69:12-20.
8. Senhorinho GNA, Nakano V, Liu C, Song Y, Finegold S, Avila-Campos MJ. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas* spp. and *Fusobacterium* spp. in dogs with and without periodontitis. Anaerobe. 2012; 18:381-5.
9. Gaetti-Jardim Jr E, Landucci LF, Lins SA, Vieira EMM, Oliveira SR. Susceptibility of strict and facultative anaerobes isolated from endodontic infections to metronidazole and β-lactams. J Appl Oral Sci. 2007;15(6):539-45.
10. Narikawa S. Distribution of metronidazole sucecptibility factors in obligate anaerobes. J of Antimicrobial Chemotherapy. 1986;18(5):565-574.

11. Gaetti-Jardim Jr E, Monti LM, Ciesielski FIN, Gaetti-Jardim EC, Okamoto AC, Schweitzer CM et al. Subgingival microbiota from Cebus apella (capuchin monkey) with different periodontal conditions. Anaerobe; 18:263-9, 2012.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard, CLSI document M11-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
13. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. J Endod. 2003;29(1):44-7.
14. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Nakamura S, Yamamoto E. Antimicrobial susceptibility of major pathogens of orofacial odontogenic infections to 11 β-lactam antibiotics. Oral Microbiol Immunol. 2002;17:285-9.
15. Ramos MMB, Gaetti-Jardim EC, Gaetti-Jardim Jr E. Resistance to tetracycline and β-lactams and distribution of resistance markers in enteric microorganisms and pseudomonads isolated from the oral cavity. J Appl Oral Sci. 2009;17 Suppl:13-8.
16. Gaetti-Jardim EC, Marqueti AC, Faverani LP, Gaetti-Jarim Jr E. Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. J Appl Oral Sci. 2010;18(6):551-9.
17. Casarin RCV, Ribeiro EP, Sallum EA, Nociti Jr FH, Gonçalves RB, Casati MZ. The combination of amoxicillin and metronidazole improves clinical and microbiologic results of one-stage, full-mouth, ultrasonic debridement in aggressive periodontitis treatment. J Periodontol. 2012;83:988-98.

Tabela 1. Susceptibilidade dos 207 isolados clínicos recuperados da periodontite crônica e agressiva ao metronidazol.

Isolados (N)	%			CIM(µg/mL)		
	S	I	R	variação	CIM_{50}[a]	CIM_{90}[b]
A. actinomycetemcomitans (23)	65,2	17,4	17,4	≤0,006-64	0,125	32
Bacteroides sp. (12)	100	0,0	0,0	≤0,006-2	0,125	2
Eubacterium spp. (15)	100	0,0	0,0	≤0,006-1	≤0,006	2
E. lentum (3)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,5
Fusobacterium sp. (4)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,125
F. nucleatum (35)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	0,125	0,5
F. periodonticum (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,125
P. micra (14)	92,9	7,1	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
Peptostreptococcus sp. (9)	100	0,0	0,0	≤0,006-4	0,125	1
P. anaerobius (4)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,5

Porphyromonas sp. (11)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,25	0,125	0,25
P. gingivalis (25)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,25	0,125	0,5
Prevotella sp. (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
P. intermedia (20)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	1
P. nigrescens (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
Veillonella sp. (11)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,25	≤0,006	0,25
Total (207)	95,7	2,4	1,9	≤0,006-64	0,125	2

[a]Concentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas; [b]Concentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas.