

Susceptibilidade Antimicrobiana ao Metronidazol de Microrganismos Isolados de Periodontite Crônica e Agressiva

Antimicrobial susceptibility to metronidazole of microorganisms isolated from chronic and aggressive periodontitis

Susceptibilidad antimicrobiana de metronidazol de microorganismos aislados de periodontitis crónica y agresiva

Diego Costa **Ahern**¹
Christiane Marie **Schweitzer**²
Alvimar Lima de **Castro**³
Gilberto Aparecido **Coclete**⁴
Ana Cláudia **Okamoto**⁴
Elerson **Gaetti-Jardim Jr**⁴

¹Aluno de graduação. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

²Departamento de Matemática. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

³FUNEC – Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul

⁴Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Brasil

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 microrganismos 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.

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais representam problemas de saúde graves e afetam todos os grupos étnicos, independentemente de gênero e condições

socioeconômicas da população¹. Elas são o resultado da perda de equilíbrio entre a resposta imunológica e fatores de virulência da microbiota residente². 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 microbiano⁵, 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 colaterais⁷. Além disso, a utilização generalizada de agentes antimicrobianos contra anaeróbios orais tem sido associada com um aumento significativo da resistência aos antibióticos⁸. 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 Brasil⁹, 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-o¹⁰.

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 MÉTODO

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 Armitage² (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 à 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 dos 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 N₂ + 10% de CO₂), a 37 ° C, por 14 e 3 dias, respectivamente. Após o isolamento primário e obtenção de cultura pura, os isolados foram identificados segundo suas características morfológicas, 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 susceptibilidade 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 10⁵ 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 Institute¹². As placas teste e controle foram incubadas em anaerobiose (90% N₂ + 10% CO₂), a 37° 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*

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
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (23)	65,2	17,4	17,4	≤0,006-64	0,125	32
<i>Bacteroides</i> sp. (12)	100	0,0	0,0	≤0,006-2	0,125	2
<i>Eubacterium</i> spp. (15)	100	0,0	0,0	≤0,006-1	≤0,006	2
<i>E. lentum</i> (3)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,5
<i>Fusobacterium</i> sp. (4)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,125
<i>F. nucleatum</i> (35)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	0,125	0,5
<i>F. periodonticum</i> (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,125
<i>P. micra</i> (14)	92,9	7,1	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
<i>Peptostreptococcus</i> sp. (9)	100	0,0	0,0	≤0,006-4	0,125	1
<i>P. anaerobius</i> (4)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,5
<i>Porphyromonas</i> sp. (11)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,25	0,125	0,25
<i>P. gingivalis</i> (25)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,25	0,125	0,5
<i>Prevotella</i> sp. (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
<i>P. intermedia</i> (20)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	1
<i>P. nigrescens</i> (7)	100	0,0	0,0	≤0,006-0,5	≤0,006	0,25
<i>Veillonella</i> 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

^aConcentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas; ^bConcentração inibitória mínima para 50% das amostras testadas.

(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 brasileiro⁹.

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 sul⁹. Além disso, a resistência antimicrobiana tem se expandido consideravelmente, o que tornou hábitos de prescrição tradicionais crítico na ausência de exames laboratoriais¹³. Este fato limita a eficácia do tratamento e pode dificultar o estabelecimento 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 avançados 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 resistência ao metronidazol permanece restrita a microrganismos que nunca foram sensíveis a esse agente, como os anaeróbios facultativos¹⁰. Os

resultados apresentados na Tabela 1 estão parcialmente de acordo com essa posição, visto que apenas isolados de *A. actinomycetemcomitans* se mostraram resistentes 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 Narikawa¹⁰ (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 cefalosporinas¹⁷.

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.

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: Sinusite, Terceiro Molar, Patologia, Região infra orbitária.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad microbiana a metronidazol de microorganismos aislados de pacientes con periodontitis crónica o agresiva. Las muestras se obtuvieron de 50 pacientes con periodontitis y los microorganismos se aislaron sobre medios de cultivo selectivos y no selectivos, identificados por métodos bioquímicos y probado para la susceptibilidad a metronidazol. Los resultados evidenciaron la susceptibilidad a metronidazol entre anaerobios gram negativos y algunos de susceptibilidad intermedia y la resistencia entre los anaerobios Gram-positivos y facultativos.

Palabras clave: Periodontitis, Bacterias, Metronidazol, Pruebas de Sensibilidad Microbiana.

REFERÊNCIAS

- 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: 234-9.
- Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; 53: 70–88.
- Gaetti-Jardim Jr E, Okamoto AC, Melo ME, Schweitzer CM. Opportunistic microorganisms in patients with head and neck trauma. *Arch Health Invest*. 2013; 2(1): 16-23.
- Ramos MMB, Mendonça MR, Pellizzer EP, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E. Associação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas crônicas – revisão de literatura. *Arch Health Invest*. 2013; 2(1): 24-31.
- 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. *Int J Paediat Dent*. 2012; 22(4): 310–6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Narikawa S. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J Antimicrob Chemother*. 1986; 18(5): 565-74.
- 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*. 2012 18(3):263-9.doi 10.1016/.
- 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-Jardim 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.

Correspondência**Christiane Marie Schweitzer**²Departamento de Matemática.Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

UNESP, Brasil

chris@mat.feis.unesp.br

Submetido em 18/08/2013**Aceito em** 07/12/2013