

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE UM PROTOCOLO DE DESINFECÇÃO DO CAMPO OPERATÓRIO ENDODÔNTICO POR MEIO DE CULTURA MICROBIANA E PCR

Palavras-Chave: ENDODONTIA, MICROBIOLOGIA, DESINFECÇÃO

Autores:

SARAH ACKEL MÜLLER FERREIRA, FOP-UNICAMP

JULIANA DELATORRE BRONZATO, FOP-UNICAMP

ANA BEATRIZ SAFADY LOPES, FOP-UNICAMP

PEDRO IVO DA GRAÇA FAGUNDES, FOP-UNICAMP

LARISSA DE SOUZA OLIVEIRA, FOP-UNICAMP

ERICA MENDES LOPES, FOP-UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES (orientadora), FOP-UNICAMP

INTRODUÇÃO

O início e a persistência de lesões periapicais inflamatórias são determinados pela presença de microrganismos no sistema de canais radiculares (Takehashi et al., 1965). Assim, muitas das pesquisas realizadas na área de Endodontia apresentam como principal objetivo a identificação dos componentes da comunidade microbiana nos diversos tipos de infecções endodônticas (Gomes et al., 2004, 2021a; Alves-Silva et al., 2023).

A quebra na cadeia asséptica pode levar à introdução inadvertida de microrganismos no sistema de canais radiculares (Zahran et al., 2022), sendo isso um obstáculo tanto para o sucesso do tratamento quanto para análises do conteúdo microbiano encontrado nos condutos radiculares (Möller, 1966). De forma a evitar contaminação pela saliva do paciente durante o tratamento, um procedimento adotado pelos profissionais é o isolamento absoluto do dente com lençol de borracha (Cochran et al., 1989). Previamente ao procedimento endodôntico, o campo operatório, assim como o dente a ser tratado, precisa ser submetido a uma desinfecção, sendo de suma importância verificar a efetividade de protocolos utilizados para essa finalidade.

Um dos métodos usados pra identificar presença de microrganismos em uma amostra é a cultura. No entanto, aproximadamente 40 a 60% da microbiota da cavidade oral é constituída por microrganismos não passíveis de cultivo (Montagner et al., 2010; Siqueira e Rôças, 2013; Benn et al., 2018; Íriboz et al., 2018; Khelaifia et al., 2023), o que pode levar a resultados incompletos. Nesse contexto, um avanço importante para os estudos na área de Microbiologia foi o desenvolvimento de técnicas moleculares como nested PCR (Spratt, 2004; Gomes et al., 2021b; Gabrielli et al., 2022) e *next*

generation sequencing (NGS) (Gomes et al., 2015, 2021b; Muzzey et al., 2015; Nardello et al., 2020), métodos cada vez mais sensíveis.

Assim, é de suma importância validar se os protocolos de descontaminação do campo operatório utilizados estão sendo efetivos, de forma a evitar a detecção de microrganismos que não fazem parte da microbiota dos canais ou até mesmo da microbiota oral.

Desse modo, o objetivo desse trabalho foi verificar a efetividade de um protocolo de desinfecção do campo operatório endodôntico por meio de cultura e de PCR.

METODOLOGIA

Os procedimentos para coleta das amostras foram realizados nas Clínicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-Unicamp), e o processamento do material coletado foi realizado no Laboratório de Microbiologia da área de Endodontia da referida instituição.

Foram coletadas amostras da região compreendendo a parte externa da coroa do dente, grampo, e porção do lençol de borracha delimitada pelo arco de Ostby durante 9 tratamentos endodônticos. Todas as coletas foram realizadas por meio de fricção da superfície do campo operatório, durante 1 minuto, com swabs previamente embebidos em soro fisiológico estéril, de forma a otimizar a cultura.

Após as coletas, os swabs foram acondicionados em microtubos do tipo *ependorf* previamente esterilizados contendo 1,0 mL do meio de transporte pré-reduzido VMGA III. Para que isso fosse possível, os swabs tiveram suas hastes cortadas com uma tesoura íris reta esterilizada, de forma que a extremidade contendo o esfregaço pudesse ser incluída dentro do *ependorf*.

A primeira amostra de cada paciente foi coletada logo após o isolamento absoluto (AD - “antes da desinfecção”), e a segunda, após a realização do protocolo de desinfecção do campo operatório (DD - “depois da desinfecção”), que consistiu em friccionar a superfície utilizando swabs estéreis embebidos em uma sequência de substâncias: peróxido de hidrogênio a 30% por 1 minuto, seguido por hipoclorito de sódio a 2,5% por 1 minuto, o qual foi neutralizado com solução de tiosulfato de sódio a 5%.

Procedimentos para cultura microbiana

Durante o processamento laboratorial, antes da inoculação em placas com meio de cultura, foi realizada diluição seriada das amostras em meio Fastidious Anaerobe Broth (FAB). As amostras do grupo “AD” foram diluídas até uma concentração de 10^{-2} , enquanto as amostras do grupo “DD” foram diluídas apenas até 10^{-1} , por ser esperada uma menor quantidade de microrganismos após a desinfecção.

A inoculação foi realizada pipetando 25 μ L de cada amostra em placas contendo Sabouraud-Dextrose Agar acrescido de 0,1% de cloranfenicol — seletivo para espécies de levedura —, que foram inoculadas aerobicamente em temperatura ambiente, e em placas contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado e Fastidious Anaerobe Agar, que foram incubadas anaerobicamente, em estufa a 37 °C.

Após o período de incubação, foi verificado o crescimento microbiano por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Procedimentos para análise por técnica molecular

As extrações de DNA das amostras foram realizadas com o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a leitura da concentração de DNA presente nas amostras foi realizada a 260 nm por meio de espectrofotometria (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

As reações de PCR foram processadas em um termociclador, na quantidade total de 25 µL para cada amostra, contendo 2,5 µL de tampão para reação de PCR (10x Reaction Buffer, Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil); 2,5 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (2 mM) (dNTPs, Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil); 1,5 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM) (MgCl₂, Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil); 0,625 µL de uma solução 100 µM de primer forward (20 mM) (Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil); 0,625 µL de uma solução 100 µM de primer reverse (20 mM) (Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil); 13,125 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase; 0,125 µL da enzima Taq DNA polimerase (Platinum™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen™, São Paulo, SP, Brasil) e 4 µL de DNA extraído da amostra.

Para detecção dos microrganismos *Enterococcus faecalis* (bactéria) e *Candida albicans* (fungo), foi realizada a técnica de nested-PCR, a qual compreende 2 reações. Na primeira, são utilizados *primers* universais para amplificação. Os produtos dessa reação são utilizados para a segunda, em que usa-se um *primer* espécie-específico para detecção do microrganismo de interesse.

Para a detecção bacteriana, foi amplificada a região que abrange os genes 16S e 23S rRNA por meio dos seguintes *primers* universais: Univ Forward (785) 16S 5' GGATTAGATACCCTGGTAGTC 3'; Univ Reverse (L422) 23S 5' GGAGTATTTAGCTT 3'. A amplificação compreendeu uma desnaturação inicial (97 °C, 1 min); 26 ciclos de desnaturação (97 °C, 45 s), anelamento (55 °C, 45 s) e extensão (72 °C, 1 min); seguidos de uma extensão final (72 °C, 4 min).

Verificado o sucesso da reação universal, alíquotas dos produtos dessa reação foram utilizadas para realização de outra PCR, dessa vez utilizando um *primer* espécie-específico *forward* para detecção de *E. faecalis* (5' GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCA 3'), juntamente com o primer *reverse* L189 (5' GGTACTTAGATGTTTCAGTTC 3'). Essa reação de PCR compreendeu uma desnaturação inicial (95 °C, 2 min); 27 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento (52 °C, 2 min) e extensão (72 °C, 3 min); seguidos de uma extensão final (72 °C, 10 min).

Para a detecção fúngica, foram utilizados *primers* que têm como alvo a região que abrange o gene 18S rRNA: Yeast Universal Forward 5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'; Yeast Universal Reverse 5' GGTCCGTGTTTCAAGACG 3'. A reação compreendeu uma desnaturação inicial (94 °C, 4 min); 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), anelamento (66 °C, 1 min e 30 s) e extensão (72 °C, 15 s); e uma extensão final (72 °C, 5 min). Os fragmentos resultantes dessa etapa foram submetidos à segunda reação, em que foi utilizado o *primer forward* espécie-específico para *C. albicans* (5'

TTGGAGCGGCAGGATAATGG 3') e manteve-se o *primer reverse* da primeira reação, configurando uma seminested-PCR. Essa reação, assim como a primeira, compreendeu uma desnaturação inicial (94 °C, 4 min); 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), anelamento (66 °C, 1 min e 30 s) e extensão (72 °C, 15 s); e uma extensão final (72 °C, 5 min).

Ao final de cada uma das reações de PCR descritas, os produtos foram corados com Novel Juice, e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen™, Life Technologies do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (TBE) (pH 8,0). Foi incluído em cada gel um padrão de peso molecular com 18 bandas em um intervalo de 100 a 15000 pb (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™, Life Technologies do Brasil). Após o término de cada corrida (100 volts por 60 min), as bandas foram observadas com transiluminador de luz ultravioleta. A identificação negativa ou positiva foi baseada, respectivamente, na ausência ou na presença de bandas íntegras e com tamanho e peso molecular esperados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da contagem microbiana estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Contagem microbiana em UFC/mL nas placas de Fastidious Anaerobe Agar (FAA) e de Sabouraud-Dextrose Agar (SDA)

Amostra	FAA+sangue		SDA	
	AD	DD	AD	DD
1	26000	0	10800	0
2	0	0	0	0
3	3320	0	0	0
4	40	0	280	0
5	1080	0	0	0
6	120	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0

Quanto à análise dos géis de eletroforese, não foram observadas bandas indicando presença nas amostras de DNA bacteriano na reação universal, ou de DNA de *E. faecalis* na reação espécie-específica.

Na reação universal para detecção fúngica, foram observadas bandas em 44,4% das amostras coletadas após a desinfecção do campo operatório. Na reação específica para *C. albicans*, foram observadas bandas indicando presença de DNA dessa espécie em 22,2% das amostras coletadas após a desinfecção.

CONCLUSÕES

Por meio da análise dos resultados da cultura, o protocolo de desinfecção foi efetivo para eliminar os microrganismos cultiváveis viáveis. Quanto ao método molecular, novos agentes antimicrobianos deverão ser testados para alcançar negatividade na amplificação.

BIBLIOGRAFIA

Alves-Silva EG, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, de-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on the reduction of bacteria and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2023 Mar;41:103292. doi: 10.1016/j.pdpdt.2023.103292.

Benn A, Heng N, Broadbent JM, Thomson WM. Studying the human oral microbiome: challenges and the evolution of solutions. *Aust Dent J*. 2018 Mar;63(1):14-24. doi: 10.1111/adj.12565.

Cochran MA, Miller CH, Sheldrake MA. The efficacy of the rubber dam as a barrier to the spread of microorganisms during dental treatment. *J Am Dent Assoc*. 1989 Jul;119(1):141-4. doi: 10.14219/jada.archive.1989.0131.

Gabrielli ES, Lima AR, Francisco PA, Herrera DR, de-Jesus-Soares A, Ferraz CCR, et al. Comparative analysis of bacterial content, levels of lipopolysaccharides and lipoteichoic acid in symptomatic and asymptomatic endodontic infections at different stages of endodontic treatment. *Clin Oral Investig*. 2022 Jan;26(1):287-302. doi: 10.1007/s00784-021-03998-2.

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. doi: 10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J Endod*. 2015 Dec;41(12):1975-84. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.022.

Gomes BPFA, Bronzato JD, Almeida-Gomes RF, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC. Identification of *Fusobacterium nucleatum* in primary and secondary endodontic infections and its association with clinical features by using two different methods. *Clin Oral Investig*. 2021a Nov;25(11):6249-6258. doi: 10.1007/s00784-021-03923-7.

Gomes BPFA, Francisco PA, Godoi EP Jr, Endo MS, Barbosa-Ribeiro M, Delboni MG, et al. Identification of Culturable and Nonculturable Microorganisms, Lipopolysaccharides, and Lipoteichoic Acids From Root Canals of Teeth With Endodontic Failure. *J Endod*. 2021b Jul;47(7):1075-1086. doi: 10.1016/j.joen.2021.04.011.

İriboz E, Arıcan Öztürk B, Kolukırk M, Karacan I, Sazak Öveçoğlu H. Detection of the unknown components of the oral microflora of teeth with periapical radiolucencies in a Turkish population using next-generation sequencing techniques. *Int Endod J*. 2018 Dec;51(12):1349-1357. doi: 10.1111/iej.12956.

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. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0.

Khelaifia S, Virginie P, Belkacemi S, Tassery H, Terrer E, Aboudharam G. Culturing the Human Oral Microbiota, Updating Methodologies and Cultivation Techniques. *Microorganisms*. 2023; 11(4):836. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040836>

Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*. 1966 Dec 20;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.

Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-165. doi: 10.1007/s40142-015-0076-8.

Nardello LCL, Amado PPP, Franco DC, Cazares RXR, Nogales CG, Mayer MPA, et al. Next-Generation Sequencing to Assess Potentially Active Bacteria in Endodontic Infections. *J Endod*. 2020 Aug;46(8):1105-1112. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.004.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J Oral Microbiol*. 2013 May 23;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.21077.

Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Top*. 2004 Nov;9(1):5-14. doi: 10.1111/j.1601-1546.2004.00106.x.

Zahran S, Mannocci F, Koller G. Assessing the Iatrogenic Contribution to Contamination During Root Canal Treatment. *J Endod*. 2022 Apr;48(4):479-486. doi: 10.1016/j.joen.2022.01.007.