

# BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ISOLADAS DE CANAIS RADICULARES DE DENTES DESVITALIZADOS E REFROTÁRIOS AO TRATAMENTO ENDODÔNTICO. ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Elerson GAETTI-JARDIM JÚNIOR\*

Denise PEDRINI\*\*

Gilson Machado D'ANTÔNIO\*

- RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas de canais radiculares de dentes desvitalizados e refratários ao tratamento endodôntico convencional. Vinte isolados de *Prevotella intermedia*, dezoito de *Fusobacterium nucleatum* e dez do gênero *Peptostreptococcus* sp foram submetidos a testes de suscetibilidade pelo método de diluição em ágar. A leitura foi realizada após 48 horas de incubação, em anaerobiose, a 37°C. Todos os isolados foram sensíveis a cefoxitina, clindamicina, imipenem, lincomicina e metronidazol, enquanto alguns foram resistentes à ampicilina, cefalotina, eritromicina, penicilina G e tetraciclina.
- PALAVRAS-CHAVE: Resistência microbiana a drogas; bactérias anaeróbicas; cavidade da polpa dentária.

## Introdução

Os microrganismos anaeróbios constituem o grupo numericamente mais significativo da microbiota humana, podendo ser isolados de uma grande variedade de processos patológicos, particularmente de infecções anaeróbias mistas,<sup>9</sup> incluindo-se as periapicopatias.<sup>19</sup>

A participação de microrganismos anaeróbios obrigatórios no desenvolvimento de lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico tem levado ao desenvolvimento de regimes terapêuticos específicos. Assim, a resolução desses processos patológicos freqüentemente associa o tratamento endodôntico convencional à antibioterapia, sistêmica ou local, com cirurgias pararendodônticas.

No entanto, o uso inadequado de antimicrobianos, resultando no desequilíbrio da microbiota indígena bucal, é extremamente desfavorável. Desde que as periapico-

---

\* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – Araçatuba – 16015-050 – SP.

\*\* Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia – UNESP – Araçatuba – 16015-050 – SP.

patias constituem processos infecciosos de natureza mista, podendo os diferentes microrganismos envolvidos apresentar diferentes espectros de suscetibilidade aos antimicrobianos, a escolha das drogas deve ser direcionada a esses fatores.

Como agravante, deve ser considerado que a experiência, no Brasil, em relação à determinação dos padrões de suscetibilidade a drogas antimicrobianas para bactérias anaeróbias é escassa,<sup>5,10</sup> o que contrasta com a importância desses microrganismos como agentes de numerosos processos patológicos localizados ou sistêmicos.

Desta forma, considerando a importância dos microrganismos anaeróbios como integrantes da microbiota autóctone humana e sua importância na área médico-odontológica, este estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas de canais radiculares de dentes desvitalizados e portadores de lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico convencional.

## Material e método

### Microrganismos

Um total de 48 cepas bacterianas foi submetido aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os isolados de *Prevotella intermedia* (20), *Fusobacterium nucleatum* (18) e *Peptostreptococcus* sp (10) foram obtidos de canais radiculares de dentes portadores de lesões refratárias ao tratamento endodôntico convencional. Para tanto, amostras clínicas foram colhidas de 14 pacientes, de ambos os sexos, de 16 a 50 anos, que se submeteram a tratamento endodôntico por, pelo menos, 6 meses, sem que ocorresse a remissão da sintomatologia clínica, ou desaparecimento radiográfico da lesão periapical.

Os pacientes não apresentavam comprometimento sistêmico e todos fizeram uso de antimicrobianos, particularmente penicilina G, penicilina V, amoxicilina e ampicilina, nos 6 meses que precederam a coleta, embora em apenas seis pacientes este uso de drogas foi realizado de acordo com as instruções do cirurgião-dentista e não por automedicação.

Previamente à coleta dos espécimes clínicos, realizava-se o isolamento absoluto do campo operatório com auxílio de dique de borracha, bem como a anti-sepsia do elemento dental e desinfecção do dique por meio de solução de PVPI (polivinilpirrolidona iodo).

A seguir, procedia-se à desobstrução dos condutos radiculares, com a remoção cuidadosa do curativo de demora ou material obturador, seguida de abundante irrigação com solução de Ringer pré-reduzida (Ringer-PRAS).

A coleta dos espécimes foi realizada introduzindo-se cones de papel absorvente esterilizados (autoclave, 121°C/15 minutos) no conduto radicular, onde permaneciam por 1 minuto. Após esse período de tempo, os cones eram transferidos para tubos contendo 2,0 ml de solução de Ringer-PRAS, sob fluxo de CO<sub>2</sub>, de forma similar à descrita por Tronstad et al.<sup>23</sup>

Os espécimes foram agitados em *vortex* por 60 segundos e, em seguida, realizavam-se diluições seriadas em solução Ringer-PRAS. De diluições preestabelecidas, alíquotas de 0,1 ml eram transferidas para placas, em duplicata, contendo ágar sangue (ágar infuso de cérebro coração – Difco, enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro) com hemina e menadiona. As placas eram incubadas a 37°C, em jarras GASPAC, em condições de anaerobiose, por 10 dias.

As cepas bacterianas foram identificadas segundo suas características bioquímico-fisiológicas, morfocoloniais e morfocelulares, como apresentado na literatura.<sup>7,12,18</sup>

## **Método dos testes, meio de cultura e inóculo bacteriano**

A concentração inibitória mínima (CIM) para as diferentes drogas foi determinada empregando-se o método de diluição em ágar, descrito por Sutter et al.<sup>21</sup> em 1979 e sancionado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

O meio de cultura empregado foi o ágar infuso de cérebro coração (Difco) suplementado com 0,5% de extrato de levedura.

Utilizou-se um inóculo bacteriano de 10<sup>5</sup> células/spot, o qual foi transferido para as placas de Petri contendo meio de cultura com e sem antimicrobiano, em duplicata, por meio de um multiinoculador.

## **Antimicrobianos, incubação e leitura dos resultados**

Os antimicrobianos empregados foram: ampicilina (Bayer S. A., Brasil), cefalotina (Glaxo do Brasil S.A., Brasil), cefoxitina (Merck Sharp & Dohme Ltda., Brasil), clindamicina (Rhodia Farma Ltda., Brasil), eritromicina (Abbot Ltda., Brasil), imipenem (Merck Sharp & Dohme Ltda., Brasil), lincomicina e metronidazol (Rhodia S.A., Brasil), penicilina G (Fontoura-Wyeth S.A., Brasil) e tetraciclina (Forchemicals Ltda., Brasil).

As soluções-estoques de cada antimicrobiano foram preparadas em água destilada esterilizada, no mesmo dia do teste, e esterilizadas por filtração (filtros Millipore 0,22 µm). Diferentes alíquotas foram transferidas para os meios de cultura até atingir as concentrações desejadas (0,125 µg/ml a 512 µg/ml), como preconizado pelo NCCLS.

As placas inoculadas, em duplicata, eram incubadas em condições de anaerobiose, a 37°C, por 48 horas.

Como controle dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos foram empregadas as cepas de referência *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953, *Bacteroides fragilis* ATCC 23745 e *Eubacterium lentum* ATCC 25559, incubadas nas mesmas condições das cepas-teste. Em todos os testes, foram inoculados meios de cultura sem droga no início e no término do processo de inoculação, para verificar a viabilidade celular bacteriana e de contaminação.<sup>10</sup>

Após o tempo de incubação, realizava-se a leitura dos resultados, verificando-se a inibição ou não do crescimento microbiano nas placas com antimicrobianos, quando comparadas com as placas controle (sem antimicrobianos).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir, completamente, o crescimento bacteriano.

Considerou-se como resistente aos antimicrobianos o isolado que foi capaz de crescer em concentração maior ou igual ao ponto crítico da droga, que corresponde à maior concentração que o antimicrobiano atinge, no sangue, com finalidade terapêutica.

## Resultado

A Tabela 1 mostra a porcentagem de resistência de 20 isolados de *P. intermedia* para dez drogas antimicrobianas, enquanto as Tabelas 2 e 3 o fazem para 18 isolados de *F. nucleatum* e 10 isolados de *Peptostreptococcus* sp, respectivamente.

Para *P. intermedia* observou-se a presença de marcadores de resistência para ampicilina, cefalotina, penicilina G e tetraciclina (Tabela 1), enquanto para *F. nucleatum* verificou-se a presença de cepas resistentes a ampicilina, eritromicina e penicilina G (Tabela 2). Quanto aos isolados de *Peptostreptococcus*, encontrou-se apenas uma cepa resistente à tetraciclina e à penicilina G.

Tabela 1 – Suscetibilidade de vinte isolados de *P. intermedia* a dez antimicrobianos

Agente antimicrobiano*	CIM			R <sup>d</sup> (%)
	Faixa	50% <sup>b</sup>	90% <sup>c</sup>	
Ampicilina (Amp)	≤ 0,125 – 128	4	32	20
Cefalotina (Ct)	≤ 0,125 – 32	0,5	8	10
Cefoxitina (Cx)	≤ 0,125 – 8	0,5	4	0
Clindamicina (Cl)	≤ 0,125 – 1	≤ 0,125	0,5	0
Eritromicina (Er)	≤ 0,125 – 8	2	8	0
Imipenem (Im)	≤ 0,125 – 2	≤ 0,125	0,5	0
Lincomicina (Li)	≤ 0,125 – 2	0,25	2	0
Metronidazol (Mz)	≤ 0,125 – 2	≤ 0,125	0,25	0
Penicilina G (Pe)	≤ 0,125 – 128	4	64	20
Tetraciclina (Te)	≤ 0,125 – 64	≤ 0,125	4	5

<sup>a</sup>Pontos críticos adotados (µg/ml): Amp, 16; Ct, 16; Cx, 16; Cl, 4; Er, 16; Im, 8; Li, 16; Mz, 16; Pe, 16; Te, 8.

<sup>b</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 50% das cepas testadas.

<sup>c</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 90% das cepas testadas.

<sup>d</sup>Percentual de resistência.

Tabela 2 – Suscetibilidade de dezoito isolados de *F. nucleatum* a dez antimicrobianos

Agente antimicrobiano*	CIM			R <sup>d</sup> (%)
	Faixa	50% <sup>b</sup>	90% <sup>c</sup>	
Ampicilina (Amp)	≤ 0,125 – 32	0,25	8	5,55
Cefalotina (Ct)	≤ 0,125 – 4	≤ 0,125	1	0
Cefoxitina (Cx)	≤ 0,125 – 8	0,25	2	0
Clindamicina (Cl)	≤ 0,125 – 2	≤ 0,125	0,5	0
Eritromicina (Er)	4 – 128	8	64	33,33
Imipenem (Im)	≤ 0,125 – 8	≤ 0,125	0,5	0
Lincomicina (Li)	≤ 0,125 – 4	≤ 0,125	0,5	0
Metronidazol (Mz)	≤ 0,125 – 2	≤ 0,125	0,5	0
Penicilina G (Pe)	≤ 0,125 – 32	0,25	16	5,55
Tetraciclina (Te)	≤ 0,125 – 8	≤ 0,125	4	0

<sup>a</sup>Pontos críticos adotados (µg/ml): Amp, 16; Ct, 16; Cx, 16; Cl, 4; Er, 16; Im, 8; Li, 16; Mz, 16; Pe, 16; Te, 8.

<sup>b</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 50% das cepas testadas.

<sup>c</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 90% das cepas testadas.

<sup>d</sup> Percentual de resistência.

Tabela 3 – Suscetibilidade de dez isolados de *Peptostreptococcus* sp a dez antimicrobianos

Agente antimicrobiano*	CIM			R <sup>d</sup> (%)
	Faixa	50% <sup>b</sup>	90% <sup>c</sup>	
Ampicilina (Amp)	≤ 0,125 – 16	≤ 0,125	1,0	0
Cefalotina (Ct)	≤ 0,125 – 8	≤ 0,125	0,5	0
Cefoxitina (Cx)	≤ 0,125 – 8	≤ 0,125	0,5	0
Clindamicina (Cl)	≤ 0,125 – 1	≤ 0,125	0,5	0
Eritromicina (Er)	≤ 0,125 – 4	0,25	2	0
Imipenem (Im)	≤ 0,125 – 2	≤ 0,125	0,5	0
Lincomicina (Li)	≤ 0,125 – 1	≤ 0,125	0,5	0
Metronidazol (Mz)	≤ 0,125 – 16	0,5	4	0
Penicilina G (Pe)	≤ 0,125 – 32	≤ 0,125	8	10
Tetraciclina (Te)	≤ 0,125 – 32	≤ 0,125	8	10

<sup>a</sup>Pontos críticos adotados (µg/ml): Amp, 16; Ct, 16; Cx, 16; Cl, 4; Er, 16; Im, 8; Li, 16; Mz, 16; Pe, 16; Te, 8.

<sup>b</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 50% das cepas testadas.

<sup>c</sup>Concentração do antimicrobiano capaz de inibir 90% das cepas testadas.

<sup>d</sup> Percentual de resistência.

## Discussão

A utilização de antibioticoterapia como coadjuvante do tratamento endodôntico convencional ou mesmo de cirurgias parendodônticas vem recebendo atenção do clínico no tratamento das lesões periapicais refratárias.<sup>23</sup>

A participação de microrganismos anaeróbios nesses processos é evidenciada pela literatura,<sup>23</sup> de forma que os antimicrobianos a serem utilizados devem atuar sobre esse amplo grupo bacteriano.

Contudo, a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para bactérias anaeróbias não faz parte da rotina da absoluta maioria dos laboratórios de microbiologia, talvez como resultado de falhas no isolamento dessas bactérias a partir de espécimes clínicos, de forma que os padrões de suscetibilidade desses microrganismos precisam ser avaliados periodicamente, posto que desempenham importante papel em numerosos processos infecciosos sistêmicos ou localizados.<sup>22</sup>

Os resultados mostraram que todos os isolados de *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *Peptostreptococcus* sp foram sensíveis à cefoxitina, clindamicina, imipenem, lincomicina e metronidazol, estando de acordo com a literatura,<sup>1,2,4,11,15,16,20</sup> embora parcialmente discordantes dos resultados apresentados por Sbordone et al.,<sup>17</sup> em 1995, onde cepas dessas espécies mostraram-se resistentes ao metronidazol.

Embora todos os microrganismos testados tenham se mostrado sensíveis ao metronidazol, um isolado de *Peptostreptococcus* somente foi inibido pela concentração de 16 µg/ml, o que corresponde ao ponto crítico para esta droga. A menor sensibilidade de muitos anaeróbios Gram positivos a esse antimicrobiano também foi mostrada por Sutter & Finegold,<sup>20</sup> em 1976, que encontraram cepas capazes de se multiplicar na concentração de 256 µg/ml da droga.

De acordo com Narikawa,<sup>13</sup> em 1986, a sensibilidade dos anaeróbios obrigatórios ao metronidazol se deve à presença da enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase, que reduz o grupo nitro da droga, indispensável à sua ação antimicrobiana.

Quanto aos demais antimicrobianos, 20% dos isolados de *P. intermedia* e 5,55% dos isolados de *F. nucleatum* foram resistentes à ampicilina e penicilina G, enquanto 10% dos isolados de *P. intermedia* também foram resistentes à cefalotina. Estes resultados estão concordes com os de Aldridge et al.,<sup>3</sup> em 1983, embora os valores percentuais de resistência aqui descritos sejam mais elevados, com o que pode ter colaborado o uso, por parte dos pacientes analisados, de β-lactâmicos. Um isolado do gênero *Peptostreptococcus* mostrou-se resistente à penicilina G e à tetraciclina, fenômeno também observado por Sutter & Finegold,<sup>20</sup> em 1976.

De acordo com Appelbaum et al.,<sup>4</sup> em 1990, 21,4% das cepas de *F. nucleatum* e 51,9% das cepas de *P. intermedia* produziam β-lactamases e, segundo a literatura,<sup>14,24,25</sup> essas enzimas seriam muito mais ativas ante a penicilinas do que a cefalosporinas, o que pode explicar o menor percentual de resistência a estas últimas drogas. De acordo com Brook et al.,<sup>8</sup> em 1980 e Nord & Hedberg,<sup>14</sup> em 1990, a produção dessas enzimas está se difundindo, particularmente entre bactérias do antigo grupo

dos *Bacteroides* produtores de pigmento negro, atualmente classificadas nos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*, e nos permite relacionar com o fenômeno de aumento da prevalência de cepas resistentes, quando comparamos nossos resultados com aqueles de Sutter & Finegold,<sup>20</sup> em 1976, que mostraram como sensíveis aos  $\beta$ -lactâmicos muitos grupos microbianos atualmente considerados resistentes a esses fármacos.

A seleção e a disseminação de bactérias resistentes às penicilinas podem comprometer a utilização destas drogas no tratamento de processos infecciosos na odontologia, o que é lamentável, visto que Barclay<sup>6</sup> coloca essas drogas como as de primeira escolha para tratamento das infecções da cavidade bucal.

A marcada resistência de *F. nucleatum* à eritromicina, como mostrada na Tabela 2, também está descrita na literatura,<sup>1,20,26</sup> embora os eventos responsáveis por esta resistência, para este grupo microbiano, não estejam molecularmente esclarecidos.

Resistência à tetraciclina foi observada em um isolado de *P. intermedia* e *Peptostreptococcus* sp – fato também descrito por Sutter & Finegold –,<sup>20</sup> o que pode refletir o intenso uso que se fez desta droga em medicina e odontologia nas últimas décadas.

## Conclusão

Dentro das condições utilizadas na presente investigação, é possível chegar-se às seguintes conclusões:

- todos os isolados foram sensíveis a cefoxitina, clindamicina, imipenem, lincomicina e metronidazol;
- alguns isolados mostraram-se resistentes à ampicilina, cefalotina, eritromicina, penicilina G e tetraciclina;
- a resistência a alguns fármacos pode estar associada a seu uso, por vezes abusivo, como observado nos pacientes selecionados neste trabalho.

GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E., PEDRINI, D., D'ANTÔNIO, G. M. Susceptibility of anaerobic bacteria recovered from root canals refractory to endodontic treatment to antimicrobial agents. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.2, p.299-307, 1996.

- **ABSTRACT:** The aim of this study was evaluate the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria recovered from root canals of teeth refractory to conventional endodontic treatment. The strains of *P. intermedia* (20), *F. nucleatum* (18) and *Peptostreptococcus* sp (10) were submitted to antimicrobial susceptibility tests using an agar dilution method. All isolates were susceptible to cefoxitin, clindamycin, imipenem, lincomycin and metronidazole, and some strains were resistant to ampicillin, cephalothin, erythromycin, penicillin G and tetracycline.
- **KEYWORDS:** Drug resistance, microbial; bacteria, anaerobic; dental pulp cavity.

## Referências bibliográficas

- 1 ABU-FANAS, S. H. et al. Identification, and susceptibility to seven antimicrobial agents, of 61 gram-negative anaerobic rods from periodontal pockets. *J. Dent.*, v.19, p.46-50, 1991.
- 2 ALDRIDGE, K. E., MORICE, N., SCHIRO, D. D. In vitro activity of biapenem (L-627), a new carbapenem, against anaerobes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.38, p.889-93, 1994.
- 3 ALDRIDGE, K. E. et al. Susceptibility of anaerobic bacteria to beta-lactam antibiotics and beta-lactamase production. *J. Med. Microbiol.*, v.16, p.75-82, 1983.
- 4 APPELBAUM, P. C., SPANGLER, S. K., JACOBS, M. R.  $\beta$ -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U. S. Centers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.34, p.1546-50, 1990.
- 5 AVILA-CAMPOS, M. J. et al. Aspectos ecológicos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: aislamiento y caracterización de cepas. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v.30, p.301-5, 1988.
- 6 BARCLAY, J. K. Antibiotics revisited. *N. Z. Dent. J.*, v.86, p.44-7, 1990.
- 7 BENNETT, K. W., DUERDEN, B. I. Identification of fusobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J. Appl. Bacteriol.*, v.59, p.171-81, 1985.
- 8 BROOK, I., CALHOUN, L., YOCUM, P. Beta-lactamase-producing isolates of *Bacteroides* species from children. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.18, p.164-6, 1980.
- 9 FINEGOLD, S. M. *Anaerobic bacteria in human disease*. New York: Academic Press, 1977. 539p.
- 10 GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. *Aspectos ecológicos, fisiológicos e de susceptibilidade a antimicrobianos de espécies orais de Fusobacterium*. São Paulo, 1994. 143p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 11 GOLDSTEIN, E. J. C., CITRON, D. M. Susceptibility of anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections to ofloxacin and interaction of ofloxacin with metronidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.35, p.2447-9, 1991.
- 12 HOLDEMAN, L. V., CATO, E., MOORE, W. E. C. *Anaerobe laboratory manual*. 4.ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977. 152p.
- 13 NARIKAWA, S. Distribution of metronidazole susceptibility factors in obligate anaerobes. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.18, p.565-74, 1986.
- 14 NORD, C. E., HEDBERG, M. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev. Infect. Dis.*, v.12, suppl.2, p.S231-4, 1990.
- 15 PANKUCH, G. A., JAKOBS, M. R., APPELBAUM, P. C. Susceptibilities of 428 gram-positive and negative anaerobic bacteria by Bay Y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam, and cefoxitin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.37, p.1649-54, 1993.



- 16 ROLFE, R. D., FINEGOLD, S. M. Comparative in vitro activity of new beta-lactam antibiotics against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.20, p.600-9, 1981.
- 17 SBORDONE, L. et al. Antimicrobial susceptibility of periodontopathic bacteria associated with failing implants. *J. Periodontol.*, v.66, p.69-74, 1995.
- 18 SUMMANEN, P. et al. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. 5.ed. Singapore: Star Publ., 1993. 230p.
- 19 SUNDQVIST, G. Ecologia de la flora del conducto radicular. *Endodoncia*, v.11, p.22-7, 1993.
- 20 SUTTER, V. L., FINEGOLD, S. M. Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.10, p.736-52, 1976.
- 21 SUTTER, V. L. et al. Collaborative evaluation of a proposed reference dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.16, p.495-502, 1979.
- 22 THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: review, comments and opinions. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, v.154, p.7-10, 1991.
- 23 TRONSTAD, L., KRESHTOOL, D., BARNETT, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extra-radicular endodontic infection. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.6, p.129-36, 1990.
- 24 TUNÉR, K., LINDQVIST, L., NORD, C. E. Characterization of a new  $\beta$ -lactamase from *Fusobacterium nucleatum* by substrate profiles and chromatofocusing patterns. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.16, p.23-30, 1985.
- 25 \_\_\_\_\_. Purification and properties of a novel  $\beta$ -lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.27, p.943-7, 1985.
- 26 WALKER, C. B. et al. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *J. Clin. Microbiol.*, v.10, p.844-9, 1979.

Aceito para publicação em 9.7.1996.