

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/49494

IB/ 81787

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Universidade Estadual de Campinas

Michelle Angelini

Streptococcus crista: caracterização bioquímica,
fenotípica e genotípica

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Michelle Angelini.
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção de Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio F. Pestana de Castro

Co-Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

UNIDADE IB
Nº CHAMADA UNICAMP
Ar 43a
V EX
TOMBO BCI 49494
PROC 16-837/00
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00168876-2

BIB 10 202 27

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Angelini, Michelle

An13s

Streptococcus crista: caracterização bioquímica, fenotípica e genotípica/
Michelle Angelini.--
Campinas, SP:[s.n.], 2002

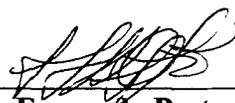
Orientador: Antonio Fernando Pestana de Castro

Co-orientador: Wanderley Dias da Silveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Identificação. 2. Genética bacteriana. 3. Bactéria-Classificação.
I. Castro, Antonio Fernando Pestana de. II. Silveira, Wanderley Dias da
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 25/02/2002

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro (Orientador)



Prof. Dr. Mário Júlio Ávila Campos



Prof. Dr. Tomomasa Yano

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

**À minha família pelo
incentivo, paciência e apoio.**

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela orientação, amizade e sobretudo pela sabedoria transmitida.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias Silveira pela co-orientação, pelo apoio e pela amizade.

À Prof^a. Dr^a. Maria Silvia Viccari Gatti pelo apoio, pela amizade e por ter participado da minha banca prévia.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano pelo apoio e por participar do meu exame de qualificação e banca definitiva.

À Prof^a. Dr^a. Lucila Costallat Ricci pelo apoio, amizade e por participar da minha banca prévia e como suplente na minha banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite pelo apoio e por participar do meu exame de qualificação.

À Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns, pelo apoio e por participar como suplente na minha banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Mário Júlio Ávila Campos pela colaboração na tese e por participar da minha banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves por participar da minha banca prévia.

Ao Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo pela colaboração na tese.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pela colaboração.

À Prof^a. Dr^a. Silvana Cai pela colaboração na tese.

Ao amigo Gerson pelo auxílio no laboratório, paciência e pela amizade.

À Tatiana pelo auxílio e amizade.

Às amigas Keila, Cristiane, Ângela, Mirtis, Leila e Adriana pelo auxílio no laboratório e sobretudo pela amizade.

Ao Zá pelo apoio, incentivo, paciência e carinho.

À amiga e sócia Débora pela compreensão, apoio e amizade.

A todos meus amigos pelo incentivo, apoio e compreensão.

A todos os amigos do Departamento de Microbiologia.

Ao Prof. Desidério e ao Paulo por terem me ensinado a dar os primeiros passos na microbiologia.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia.

À Lúcia, Lourdes e Zaira pela ajuda e atenção.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP em especial à Marizete.

Aos meus familiares.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMO	XIII
ABSTRACT.....	XV
1 Introdução	1
2 Objetivos	14
3 Material e Métodos.....	15
3.1 Cepas bacterianas, condições de cultivo e estocagem	15
3.2 Testes de identificação bioquímica.....	17
3.3 Teste de ligação à amilase salivar.....	18
3.4 Extração de DNA genômico.....	19
3.5 Teste de RAPD (Análise da amplificação ramdomica do DNA polimórfico) para identificação com iniciadores específicos (AP- PCR).....	20
3.6 Reação em cadeia da polimerase - PCR.....	23
3.7 Análise da amplificação randômica do DNA polimórfico.....	24
3.8 Microscopia eletrônica para visualização do tufo de fibrilas.....	27
3.9 Adesão em células HEp-2 e KB	28
3.10 Adesão em raspado de células bucais.....	29
3.11 Teste de coagregação.....	30
4 Resultados.....	32
4.1 Amostras bacterianas selecionadas e testes bioquímicos.....	32
4.2 Teste de AP-PCR.....	33
4.3 Análise da amplificação randômica do DNA polimórfico (RAPD).....	34

4.4	Reação da polimerase em cadeia (PCR)	40
4.5	Microscopia eletrônica para visualização do tufo de fibrilas.....	41
4.6	Adesão em células HEp-2 e KB.....	43
4.7	Adesão em raspado de células bucais	44
4.8	Reação de Imunofluorescência	45
4.9	Teste de Coagregação	45
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	57
7	APÊNDICE	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.....	11
Tabela II.....	21
Tabela III.....	25
Tabela IV.....	26
Tabela V.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1- Gel de agarose (2%) apresentando perfil de bandas obtidas a partir da amplificação das amostras padrão de *S. sanguis*, *S. crista* e C1 a C8 isoladas neste trabalho, com o iniciador RR2.....33
- Figura 2- Gel de agarose a 2% apresentando perfil de bandas obtidos a partir da amplificação obtida das amostras padrão de *S. sanguis*, *S. crista* e C1 a C8 isoladas neste trabalho, com o iniciador 434.....34
- Figura 3 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR2 com as amostras: padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 por nós isoladas36
- Figura 4 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR8 com as amostras: padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 por nós isoladas.....37
- Figura 5 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR13 com as amostras: padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 por nós isoladas.....38

Figura 6 – Dendograma obtido na análise clonal pelo teste de RAPD, baseado no UPGMA (unweighted pair group method using average linkages) usando o coeficiente de Jacard, com as seguinte amostras: padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 por nós isoladas.....39

Figura 07 – Gel de agarose demonstrando as ampliações obtidas das amostras isoladas C1 a C8 e da amostra padrão de *S. Crista* CC5AWT, com os iniciadores SRP003 e SRP004. As bandas do marcador de peso molecular correspondem à 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 900, 1000,1200 e 1500 pb.....40

Figura 8 – Fotografia de tufo de fibrilas observado na amostra padrão CC5AWT, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 16700 vezes. Barra = 149,7 nm41

Figura 9 – Fotografia de tufo de fibrilas observado na amostra C2, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 161865 vezes. Barra = 60,97 nm.....42

Figura 10 – Fotografia de tufo de fibrilas observado na amostra C8, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 83400 vezes. Barra = 120 nm.....42

Figura 11 – Fotografia de adesão positiva da amostra C1 em raspado de células bucais. Aumento de 1000 vezes.....44

Figura 12 – Fotografia de adesão positiva da amostra C8 em raspado de células bucais. Aumento de 1000 vezes.....44

Resumo

Entre as primeiras bactérias a colonizar a película salivar que recobre a superfície dental, na formação da placa bacteriana, está o *Streptococcus crista*, bactéria que foi descrita na década passada e é caracterizada por ser de difícil identificação por métodos fenotípicos tradicionais, assim como outras de seu grupo, sendo necessária sua caracterização genotípica. O *S. crista* é capaz de realizar coagregação com outras espécies orais; com a *Fusobacterium nucleatum* e *Corynebacterium matruchotii* coagrega através de um tufo de delgadas fibrilas que possui lateralmente, dando origem a estruturas peculiares denominadas de “espigas de milho”.

No presente trabalho, 87 amostras de biofilme bacteriano coletado do primeiro molar de humanos de diversas faixas etárias, da região de Campinas, foram submetidas a provas bioquímicas tradicionais e, posteriormente, sua identificação foi concluída e confirmada nos sistemas de identificação comerciais Vitek (bioMérieux) e BBL Crystal (Becton Dickison). Este último se mostrou ser para nós, o método mais eficiente. No sentido da identificação por métodos fenotípicos, realizamos ainda o teste de ligação à amilase salivar, já que o fato do *S. crista* se liga à amilase salivar pode ser considerado um parâmetro importante.

Através da técnica de coloração negativa com observação em microscópio eletrônico de transmissão, verificamos a presença do tufo de fibrilas em todos os nossos isolados, assim como em nossas amostras padrão. No teste de coagregação com a *Fusobacterium nucleatum* não obtivemos o resultado esperado, tendo obtido resultados positivos apenas com duas de nossas amostras isoladas, C6 e C7.

Testando a adesão do *S. crista* nas células HEp-2 e KB, todas as nossas amostras padrão e isoladas, apresentaram adesão negativa, talvez por estas células não apresentarem receptores específicos para estas linhagens bacterianas. Utilizando raspado de células epiteliais da mucosa jugal, testamos a adesão e obtivemos resultados positivos para todas as nossas amostras padrão e isoladas.

Na reação de imunofluorescência utilizando um soro-anti CC6, que reage com uma proteína encontrada na superfície do *S. crista*, todas as nossas amostras foram reativas.

Para caracterizar genotípicamente as amostras, realizamos o teste de AP-PCR e concluímos ser este capaz de identificar o *S. crista*. Foi realizado, também, o teste de PCR e obtivemos amplificação positiva para nossas amostras C1, C3, C7 e C8. Pelo fato do iniciador utilizado amplificar um gene encontrado apenas em amostras de *S. crista*, mas não necessariamente em todas as amostras, este resultado não descarta a possibilidade das amostras C2, C4, C5 e C6 se tratarem de *S. crista*, mesmo porque todos os resultados obtidos nos outros testes nos levam a crer que sim.

Com o objetivo de correlacionar nossas amostras de *S. crista* com outros *Streptococcus* e obter uma breve análise filogenética, analisamos o dendograma obtido pelo método de RAPD e verificamos que as amostras de *S. crista* foram agrupadas em um único grande grupo, separando-os dos demais.

Abstract

Streptococcus crista, a species of bacterium described in the last decade, is one of the first colonizing bacteria of the salivary pellicle, that recovers the dental surface, being capable of accomplish the co-aggregation with other oral bacteria and with *Fusobacterium nucleatum* and *Corynebacterium matruchotii*, through a sidelong tuft of fibrils, giving origin to structures that are called corn-cobs. The *S. crista* is Known being difficult of characterization through traditional phenotypic methods, as well as further bacteria species of its group, being therefore necessary its genotypic characterization to identified it in the laboratory.

Eighty-seven colleted samples of bacterial plate of the first molar of humans of several age groups in the area of Campinas City, State of São Paulo, were studied. These samples were submitted to traditional biocheccal tests, followed by a more reliable identification based on the commercial identification systems Vitek (bioMerieux) and BBL Crystal (Becton Dickison), being the latter the most efficient method. In addition, in the purpose of the identification by complementary phenotypic methods, the amylase salivary test was carried out, on account of the fact that the *S. crista* binds to saliva, an important property that has to be considered.

Using the negative staining technique and the respective observation by microscopic electronic transmission, it was observed the presence of the tuft of fibrils in all our isolates, as well as in standard strains. In the co-aggregation test with the *Fusobacterium nucleatum*, for unknown reasons the expected results were not obtained with all our isolates, since besides the standard strains, only our isolates C6 and C7 gave positive results in this test.

The study of adhesion of *S. crista* to the HEp-2 cells, all strains including the standard ones and ours were unable to show any adherence to this cell line, perhaps because these cells did not harbor the specific receptors *S. crista*. Conversely, using oral scraped epithelial cells all our isolates and the standard strains showed visible adherence to these cells.

In the immunofluorescence test (IFT) using rabbit serum anti-CC6 that reacts with a protein found in the *S. crista* surface, all strains were IFT+

The genotypic characterization of the strains was accomplished the AP-PCR test which has been recognized as capable of identifying the *S. crista*. The PCR test was also carried out and positive amplification was obtained for the strains C1, C3, C7 and C8. Because the primers used amplify a fragment of a gene found among strains of *S. crista*, but not necessarily in all strains, these results do not discard the possibility of the strains C2, C4, C5, and C6 be considered *S. crista*, because all the remaining results obtained in the other test did not exclude this possibility.

One of the main concerns of this research was to correlate our and the standard strains the *S. crista* strains with other streptococci to obtain a brief phylogenetic analysis. This was done by the RAPD test and the dendogram obtained showed clearly that the *S. crista* strains were placed in a cluster separated from the other streptococci.

We hope that this study were just the first step with the purpose of understanding the adhesion mechanisms of the *S. crista* and its role in the interactions that happen in the formation of the bacterial plate and in the development of other oral and systemic pathologies.

1- Introdução:

Os *Streptococcus* grupo *sanguis* estão entre as primeiras bactérias a colonizarem a película salivar que recobre a superfície dental. Este fato se deve à grande afinidade destes microrganismos às glicoproteínas salivares da película adquirida (Lancy et al., 1983). O principal fator determinante da habilidade destas células se ligarem à película adquirida, e a outras células bacterianas, são os receptores presentes em sua superfície (Jenkinson, 1994; Correia et al., 1995). A partir do momento que a película adquirida é colonizada, passa a se chamar biofilme dental que representa o acúmulo de bactérias orais aderidas à matriz de polissacarídeos, a outras bactérias e a produtos do hospedeiro na superfície dental. Sua composição microbiana quantitativa é altamente variável, sendo que a formação do biofilme dental é geralmente caracterizada por uma colonização inicial de cocos, seguida de bactérias filamentosas. Os estreptococos formam múltiplas microcolônias que são subseqüentemente invadidas por uma mistura de bacilos gram-positivos, cocos gram-negativos e filamentos, característicos do biofilme supragengival maduro (Lancy, et al., 1983). A partir deste momento, ocorre colonização microbiana sucessiva resultando em um biofilme bacteriano maduro com alta proporção de bactérias gram negativas, anaeróbias estritas e facultativas. Ligações bactéria-bactéria têm sido observadas no biofilme bacteriano maduro. Estes microrganismos, que se aderem mais tardiamente ao biofilme, eliminam os primeiros que o colonizaram (Yao et al., 1996).

Devido a um fluxo salivar contínuo que tende a remover mecanicamente as bactérias da microbiota bucal, a permanência destas na cavidade bucal depende muito da sua habilidade em aderir à superfície dental, às células epiteliais e a outras células microbianas (Jenkinson, 1994; Correia et

al., 1995). Na ausência de mecanismos de aderência as bactérias seriam deglutidas ou expelidas com a saliva. Quando estas comunidades bacterianas não são removidas sofrem alterações quantitativas e qualitativas dando origem a consórcios bacterianos ou biofilmes capazes de induzir reação inflamatória associada com alguns tipos de doença periodontal. O processo de formação e maturação da placa pode ser controlado por remoção direta (Correia et al., 1995).

O biofilme bacteriano, que se acumula na superfície dos dentes, compreende mais de 30 gêneros, representando mais de 500 espécies (Listgarten, 1999; Whittaker et al., 1996). A sequência de depósito do biofilme dental é altamente complexa, pode-se dizer que é coreografada. Como já colocado anteriormente, inicia-se a colonização por um grupo de organismos gram positivos, *Streptococcus* em sua grande maioria, seguida por uma sucessão de espécies que culminam na chegada dos gram negativos anaeróbios, como a *Porphyromonas gingivalis* (Socransky & Haffajee, 1992). A colonização do biofilme dental pela *Porphyromonas gingivalis* é um evento importante na transição de um biofilme comensal para uma entidade patogênica. A colonização pela *Porphyromonas gingivalis* é mediada pela adesão de fimbrias às superfícies orais (Amano et al., 1996; Lamont & Jenkinson, 1998). O gene *fimA*, que codifica a maior subunidade protéica da fimbria (FimA) da *Porphyromonas gingivalis*, pode ser regulado por ação do meio ambiente (Amano et al., 1994; Xie et al., 1997).

A natureza física do biofilme dental provém oportunidade para uma interação por troca de sinais célula-célula. Apesar disso, o papel da comunicação intercelular na formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano é ainda pouco conhecido. A mudança de um biofilme comensal para um biofilme relacionado à doença periodontal pode depender da relativa

proporção dos primeiros colonizadores. A interação molecular entre o *S. crista* e a *Porphyromonas gingivalis* reprime a expressão de *fimA*, tornando esta última incapaz de aderir (Xie et al., 2000). Este exemplo de interação elucidada como os componentes do mecanismo de sinalização podem promover e modular a natureza da formação do biofilme dental.

Estudos demonstram que o *S. crista* CC5A possui em sua superfície um grupo de receptores altamente conservados, que têm sido nomeado de “família da proteínas LraI” (receptores lipoproteicos para antígenos I), codificada pelo gene *scbSA*, da família de genes *lraI*. Estes receptores estão em outros membros desta família de genes, associados a funções distintas como: os polipeptídeos SsaB e FimA estão envolvidos na aderência de *S. sanguis* e *S. parasanguis*, respectivamente, a componentes da película salivar. Anticorpos contra a proteína ScaA bloqueiam a coagregação entre *S. gordonii* PK488 e *Actinomyces naeslundii* PK606 e estudos genéticos têm identificado que FimA é necessário para ligação de *S. parasanguis* à monocamada de fibrina. Apesar disso, experimentos indicam que *scbA* não desempenha um papel importante na formação do “corn cob” ou em outras formas de ligação associadas aos *Streptococcus* orais. O estudo também revelou que a perda da expressão do *scbA* não causou redução da ligação da bactéria a um filme de fibrina (Correia et al., 1996 b; Jenkinson, 1994).

Até meados da década de 80 era notoriamente difícil obter uma classificação satisfatória dos estreptococos do grupo viridans. Com a introdução do uso de técnicas de hibridização DNA-DNA, hibridização de RNA ribossômico e DNA ribossômico, bem como técnicas de sequenciamento de r-RNA, a taxonomia dos estreptococos viridans vem sendo desvendada, resultando na descrição de novas espécies (Beighton et al., 1991; Willcox, 1996). Alguns autores têm proposto técnicas que podem auxiliar na

identificação destes microrganismos. Van Der Mei et al. (1993) propuseram um novo método de identificação para os estreptococos orais, baseado em FT-IR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy), com resultados similares aos da taxonomia clássica para este grupo de bactérias .

Seis grupos genéticos distintos representam as cepas classificadas taxonomicamente como grupo “*Streptococcus sanguis*” (Handley et al., 1991; Rudney & Larson, 1993; Rudney & Larson, 1994; Willcox, 1996) ou “grupo mitis” (Kawamura et al., 1995; Rudney & Larson, 1999) os quais são denominados: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* (que normalmente inclui dois subtipos distintos), *Streptococcus parasanguis* e *Streptococcus crista* (Handley et al., 1991; Kilian et al., 1989; Whiley et al., 1990). Estas novas espécies definidas ocupam sítios orais distintos, os quais podem mudar com a maturação do biofilme dental sendo que múltiplas linhagens podem estar presentes na mesma boca (Fitzsimmons et al., 1996; Frandsen et al., 1991; Pearce et al., 1995, Rudney et al., 1994; Rudney et al., 1999).

Ao mesmo tempo em que na década passada algumas espécies ou grupos de espécies do gênero *Streptococcus* foram transferidos para outros gêneros, outros novos membros têm sido propostos. Com base nos resultados obtidos em teste de homologia de DNA-DNA, foi proposta a inclusão de duas novas espécies grupo *mitis*: *Streptococcus peroris* e *Streptococcus infantis* (Kawamura et al., 1998). A classificação dos *Streptococcus* grupo “*mitis*” ainda se encontra sujeita a novas mudanças.

A prevalência dos *Streptococcus* grupo *sanguis* pode ainda diferir em indivíduos cárie-resistente e cárie-suscetível (Rudney & Larson, 1993; Rudney & Larson, 1994). Este grupo também é conhecido por apresentar altos níveis de diversidade genotípica.

Os membros do grupo “*sanguis*” podem ser isolados da cavidade oral e da faringe e, apesar de fazerem parte da microbiota indígena, se introduzidos na corrente sanguínea podem produzir endocardite em 25% dos casos. Estudos têm demonstrado que 42 de 45 linhagens do grupo viridans de estreptococos (93%), isoladas de pacientes com endocardite infecciosa, pertencem às espécies grupo “*sanguis*” (Kikuchi et al., 1995).

As ligações célula a célula são as maiores determinantes do acúmulo bacteriano à superfície oral (van Houte, 1976). As espécies de estreptococos do grupo “*sanguis*” têm sido objeto de consideráveis investigações como colonizadores predominantes da superfície dental, os quais podem facilitar ou inibir o posterior estabelecimento de patógenos orais. Por exemplo, espécies deste grupo podem se ligar a proteínas da película adquirida e também possuem sítios de ligação para o patógeno periodontal, *Porphyromonas gingivalis* (Gibbons et al., 1991; Scannapieco et al., 1995; Yao et al., 1996). Por outro lado, eles podem competir com o *Streptococcus mutans*, o grupo de espécies acidogênicas consideradas responsáveis pela cárie dental (Nyvad & Kilian, 1990).

Os estreptococos têm um vasto repertório de propriedades de aderência, incluindo ligação a proteínas de tecidos humanos (por exemplo fibronectina, fibrinogênio, laminina, miosina, colágeno, actina e imunoglobulinas), componentes salivares (α -amilase, mucina, proteínas ricas em prolina, lizosima, etc), superfície de células do hospedeiro e outras bactérias. A aderência a glicoproteínas salivares e a outras bactérias envolve interações proteína (lectina)- carboidrato (Kolenbrander & London, 1993).

Streptococcus sanguis com um tufo de fibrilas laterais é capaz de realizar coagregação bacteriana formando comunidades no biofilme dental maduro, as espigas de milho (corncoobs), as quais já haviam sido descritas em

trabalhos na década de 80 (Correia et al., 1996 - a; Lancy et al., 1983). Coykendall & Wesbecher, (1987) descreveram estas linhagens como *Streptococcus crista*, também chamadas anteriormente de “grupo com tufo de fibrilas” e “CR grupo” (Douglas et al., 1990). Este tufo de fibrilas laterais funciona como mediador na formação de uma comunidade microbiana formada por duas células distintas que se assemelha a uma espiga de milho sendo que micrografias eletrônicas demonstram claramente que a ligação entre as duas bactérias na formação desta estrutura ocorre via este único tufo de fibrilas na superfície lateral na superfície de *S. crista* (Correia et al., 1996 - a; Lancy et al., 1983).

A “espiga de milho” é constituída por uma região central de organismos filamentosos circundados por estreptococos que se ligam aos filamentosos através de seu tufo de fibrilas polares que funciona como mediador na formação destas comunidades. Estes organismos filamentosos centrais podem ser tanto a *Corynebacterium matruchotii* (anteriormente *Bacterionema*), uma bactéria gram positiva aeróbica, quanto a *Fusobacterium nucleatum*, uma bactéria gram negativa anaeróbica (Handley et al., 1991; Correia et al., 1995; Correia et al., 1996 a). A fusobactéria é um importante habitante do biofilme bacteriano subgingival e sua presença na formação da “espiga de milho” pode servir como uma ligação entre o biofilme supra e subgingival (Lancy et al., 1983). A relativa simplicidade desta estrutura e sua morfologia distinta são propriedades que fazem dela um modelo ideal para se estudar tanto o processo de ligação como as possibilidades de comunicação entre os dois tipos bacterianos presentes (Correia et al., 1995).

O estudo da topografia do *S. crista* por microscopia eletrônica estabeleceu a localização de um tufo polar de fibrilas, determinado pelo plano de divisão celular. Adjacente às células mãe e filha, em vários estágios da

divisão, bem como nas células maduras isoladas, foram observados tufo monopolaes idênticos. Esta observação indica que o tufo polar não é apenas uma estrutura de superfície transitória, encontrada somente durante a divisão celular ou auto lise (Mouton et al., 1980).

Pelo fato de apresentarem um denso tufo de fibrilas localizado em posição lateral, em apenas um lado da célula, estas linhagens diferem das de *S. sanguis* isoladas da biofilme dental coronário, que apresentam fibrilas curtas (menor ou igual 84 nm) e esparsas, arranjadas de forma peritríquia (Handley et al., 1991; Correia et al., 1995; Correia et al., 1996a). Handley et al. (1991) e Magee et al. (1997), além de encontrarem cepas de *S. crista* no biofilme coronário, isolaram linhagens de abscessos periodontais. Handley et al. (1991) relatam ainda um tufo de fibrilas localizado em uma posição equatorial na célula e que as linhagens CR311, AK1 e CC5A possuem dois tipos de fibrilas, enquanto que a linhagem CR3 apresenta um tufo de fibrilas único e longo. Estudando mecanismos de adesão de *Streptococcus* do grupo I e II, Wyatt et al. (1987) não encontraram correlação entre a presença de fibrilas na superfície bacteriana e a habilidade da linhagem para processo de aderência.

A “espiga de milho” na placa dental humana é realmente um exemplo identificável das interações de adesão bacteriana *in vivo* e um modelo em potencial para compreensão das interações bacterianas *in vitro*. Muitos mecanismos de interação entre estes microrganismos, permanecem ainda incompreendidos sendo a identificação destes organismos um pré-requisito para este estudo.

Estudos demonstram que um dos maiores problemas para o estudo mais detalhado do *S. crista* é a sua identificação. Cada espécie do grupo de “*Streptococcus sanguis*” ou “*mitis*” é geneticamente distinta, mas apresentam muitas características em comum, o que torna difícil identificar isolados

clínicos por testes fenotípicos (Rudney et al., 1992). Apesar de sua classificação ser claramente demonstrada por homologia de DNA, sua identificação por testes fenotípicos não é conclusiva (Ezaki et al., 1988). Rudney et al. (1992) demonstram não ter conseguido em seus trabalhos obter por meio de testes fenotípicos que realizaram através do API Rapid Strep System, resultados satisfatórios para os estreptococos “*grupo mitis*” ou “*sanguis*”. Afirmam estes autores que a identificação baseada em testes genéticos evitaria estas dificuldades. Por este motivo, outros autores têm proposto métodos de identificação auxiliares, como PY-MS (Pyrolysis Mass Spectrometry) (Magee et al., 1997) e FT-IR (Fourier- Transform Infrared Spectroscopy) (Van Der Mei et al., 1993).

Um outro teste que tem sido utilizado para estudar diferenças genotípicas entre várias espécies de estreptococos é o “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD). Este método foi descrito inicialmente por Williams et al. (1990) e consiste em uma outra análise de DNA polimórfico baseado na técnica de PCR, mas que se distingue desta por consistir na amplificação do DNA genômico utilizando iniciadores arbitrários. Nesta técnica, fragmentos de DNA são amplificados com o uso de iniciadores de sequência arbitrária. Ao invés de serem utilizados pares de iniciadores que amplificam sequências-alvo específicas, empregam-se pequenos iniciadores (usualmente 9-10 pb), contendo 50 a 80% de GC e sem sequências palindrômicas. Estes iniciadores, cujas sequências são geradas ao acaso, são usados isoladamente em cada reação de amplificação (Williams et al., 1990).

A amplificação se baseia na habilidade de um único iniciador provocar a amplificação de vários fragmentos de DNA de uma fonte de material genômico. Os polimorfismos são reconhecidos através da presença ou ausência de um fragmento específico de DNA amplificado, o que pode variar

conforme a origem do material genético sob análise. Os polimorfismos podem ser gerados em várias espécies, sem que seja necessária a modificação da técnica e sem que se conheça a seqüência de DNA informativa (Welsh et al., 1992; Williams et al., 1990). Várias pesquisas vêm sendo realizadas utilizando essa metodologia para estudos taxonômicos, mapeamento genético e caracterização de germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Mouton et al. (1980), Handley et al. (1985), Douglas et al. (1990), Beighton et al. (1991), Kikuchi et al. (1995) e Willcox (1996) descreveram fenotipicamente o *S. crista* como sendo um coco gram positivo, anaeróbio facultativo, com aproximadamente de 0,8 a 1 µm de diâmetro. Em meio líquido, apresenta-se como cocos formando cadeias curtas. Apresenta reação negativa para o teste de catalase e α-hemólise sob condições de anaerobiose e aerobiose. As colônias de *S. crista* em agar Mitis Salivarius apresentam 0,5 a 1 mm de diâmetro, são circulares, lisas, regulares, pouco convexas, opacas, escuras e moles.

As principais características bioquímicas do *S. crista* estão na tabela I:

Apesar destas serem as características bioquímicas mais freqüentemente descritas, alguns autores obtiveram resultados diversos para alguns destes testes. Willcox et al. (1993) descrevem resultado positivo para hidrólise da esculina e negativo para alfa-L-fucosidase. Kikuchi et al. (1995) obtiveram resultado negativo para beta-Nacetilglucosamina e Handley et al. (1991) obtiveram resultado positivo para fosfatase alcalina, diferindo dos demais trabalhos analisados.

Segundo Douglas et al. (1990); Willcox (1996) e Handley et al. (1991), o *S. crista* foi capaz de se ligar à amilase em todas as cepas testadas. A α-amilase é a enzima mais abundante na saliva humana, e é secretada como famílias glicosiladas ou não glicosiladas, cada uma das quais constituem isoenzimas

que diferem em suas propriedades. Algumas espécies de estreptococos orais são capazes de se ligar à amilase salivar, incluindo *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus crista*. Este dado é importante para a compreensão de como se dá a interação entre bactéria e cavidade oral durante a colonização desta. Resultados de pesquisas com biofilme bacteriano humano e de outros mamíferos sugerem que estas espécies são predominantes e seu número aumenta com o desenvolvimento do mesmo (Scannapieco et al., 1994). No *Streptococcus gordonii*, a amilase se liga com alta afinidade a um grande número de sítios de ligação e a enzima localiza-se em áreas de parede celular nascente na superfície da célula (Scannapieco et al., 1989; Scannapieco et al., 1992).

Apesar das bactérias que se ligam à amilase salivar estarem em número significativo no biofilme dental supragengival, o exato papel da enzima na colonização ainda não é totalmente claro. É possível que a amilase possa funcionar como uma película receptora inicial para adesão da bactéria ao dente. A amilase pode primeiro se ligar a bactérias em solução para promover a interação entre bactérias durante a maturação do biofilme ou até impedir a adesão a superfícies do hospedeiro, facilitando a eliminação destas da cavidade oral. Pode ser que a amilase seja enzimaticamente ativa na superfície da bactéria ou ainda que estas bactérias se liguem *in vivo* à amilase para transformar o amido em uma forma que possa ser transportada na bactéria, para ser usado como fonte de energia. Scannapieco et. al. (1994), em seus estudos, concluíram que a capacidade de se ligar à amilase salivar é limitada a *Streptococcus* e que estes são encontrados em proporção substancial no biofilme dental recente, após duas horas de polimento dental, e que seu número aumenta com o tempo, durante a maturação do biofilme. Este fato é

Tabela I – Descrição das características bioquímicas do *S. crista* (Douglas et al.,1990; Beighton et al., 1991; Willcox, 1996; Williams et al., 1990)

<u>Características bioquímicas</u>	<u>Resultado</u>
Hidrólise da esculina	Negativo
Hidrólise da arginina	Positivo
Hidrólise da uréia	Negativo
Hidrólise do hipurato	Negativo
Beta-D-fucosidase	Negativo
Beta-NAGAL	Positivo
Sialidase	Negativo
Alfa-L-fucosidase	Positivo
Beta-Nacetilgalactosidase	Positivo
Alfa-glucosidase	Negativo
Beta-glucosidase	Negativo
Alfa-arabinosidase	Negativo
Fosfatase alcalina	Negativo
Acetoína (VP)	Negativo
Catalase	Negativo
Oxidase	Negativo
Produção de ácido a partir de:	
Amigdalina	Negativo
Inulina	Negativo
Manitol	Negativo
N-acetilglucosamina	Positivo
Esculina	Negativo
Sacarose	Positivo
Lactose	Positivo
Amido	Negativo
Arbutina	Positivo
Rafinose	Negativo
Sorbitol	Negativo
Trealose	Positivo
Alfa - galactosidase	Negativo

uma argumentação contrária à idéia de que a amilase auxilia na eliminação destas bactérias da cavidade oral (Kilian & Nyvad, 1990). Os estreptococos orais, que se ligam à amilase salivar, podem ter importante papel na patogênese da cárie dental pelo fato desta amilase aderida facilitar a hidrólise do amido em glucose, com conseqüente produção de ácido na placa, resultando na desmineralização da superfície dental. O fato de no biofilme dental serem encontradas bactérias que não são capazes de se ligar à amilase salivar, deixa claro que a habilidade de se ligar à amilase não controla sozinha a colonização da cavidade oral pelos estreptococos, que se sucede um complexo processo de colonização, que não se limita a um único mecanismo, e que cada espécie possui um conjunto de fatores de colonização particulares (Scannapieco et al., 1994).

Para testes bioquímicos, visando a identificação do *S. crista*, existem kits comerciais como o API 20 Strep, API ZYM e API 50 CH (Rudney & Larson, 1993; Rudney & Larson, 1994; Willcox, 1996). Um problema potencial para a identificação fenotípica dos estreptococos, e em especial do *Streptococcus crista*, é que nem todas as linhagens da mesma espécie são positivas para uma característica comum. A observação em laboratório do fenótipo de linhagens de estreptococos demonstrou outro problema: a mesma linhagem pode ter diferentes resultados para um mesmo teste em ocasiões diversas, sem corresponder a mudanças genotípicas. Desta forma a classificação fenotípica, baseada em cepas de referência, não pode identificar todos os isolados clínicos. Por estes motivos, métodos de identificação genotípica têm sido utilizados para a identificação destas espécies (Rudney et al., 1993; Rudney et al., 1994).

Um método promissor para identificação de estreptococos orais tem sido recentemente utilizado por consistir em uma simples e rápida alternativa para identificação, a “Reação da Polimerase em Cadeia” utilizando-se iniciadores arbitrários (AP-PCR) (Rudney et al., 1999). Li & Caufield (1998) avaliaram em seus estudos a identificação e caracterização genotípicas do *Streptococcus mutans* pelo método de AP-PCR e obtiveram resultados positivos.

O presente estudo visa estudar o *Streptococcus crista*, bactéria que participa na formação da “espiga de milho”, uma estrutura que serve de modelo para o entendimento dos mecanismos associados com a conversão da comunidade inicial do biofilme bacteriano em uma comunidade que evolui para uma maior frequência de bactérias anaeróbias (Lancy et al., 1983; Correia et al., 1996).

Deste modo, o estudo microbiológico do *Streptococcus crista* tem como objetivo conhecer melhor esta bactéria para que estudos futuros possam elucidar seu papel na formação do biofilme dental e seu processo de maturação, podendo-se, estabelecer estratégias futuras para controle e prevenção do desenvolvimento do biofilme bacteriano e de infecções estreptocócicas. O estudo desta espécie, com grande diversidade genotípica, pode nos dizer muito a respeito da ecologia e transmissão dos estreptococos orais (Rudney et al., 1992). Além disso, a análise da diversidade genotípica, envolvendo amostras de *S. crista* isoladas no Brasil, trará certamente uma contribuição importante, sob o ponto de vista básico e aplicado, para a microbiologia oral.

2- Objetivos

2.1- Isolar amostras de *Streptococcus crista* de biofilme bacteriano supragengival de humanos.

2.2- Identificar bioquimicamente as amostras isoladas, comparando-as com as amostras padrão.

2.3- Estudar as amostras presuntivamente identificadas como *S. crista* através da técnica de AP-PCR.

2.4- Gerar polimorfismos através de teste genotípico, como RAPD (Análise da amplificação Randômica do DNA), para caracterizar correlação entre as diferentes amostras de *S. crista* isoladas e amostras padrão.

2.5- Demonstrar através da microscopia eletrônica por coloração negativa a presença de tufo de fibrilas nas amostras isoladas (comparando-as com as linhagens padrão).

2.6- Analisar as amostras de *S. crista* quanto à sua capacidade de coagregação com as bactérias orais, em especial *Fusobacterium nucleatum*.

2.7- Estudar a adesão de amostras de *S. crista* frente a diferentes linhagens celulares (HEp-2, KB) e células bucais.

3- Material e Métodos

3.1- Cepas bacterianas, condições de cultivo e estocagem:

Em nossos estudos foram utilizadas as seguintes amostras padrão gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo, do Departamento de Microbiologia da Escola de Medicina Dental da Universidade da Pennsylvania: *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b. Outras amostras de *Streptococcus* orais utilizadas em nosso trabalho foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Silvana Cai, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo e são elas: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*.

Na realização do teste de RAPD, ainda, foram utilizadas duas amostras de *Streptococcus suis* originalmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Gottschalk, da Faculdade de Medicina Veterinária de Saint-Hyacinthe, Universidade de Montreal, Canadá: denominadas *Streptococcus suis* 2 e *Streptococcus suis* 527.

Foi utilizada ainda uma linhagem de *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mário Júlio Ávila Campos, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As amostras a serem estudadas foram isoladas do biofilme bacteriano supragengival, coletado do primeiro molar, de 87 pacientes de várias faixas etária, voluntários da Clínica Odontológica da Universidade São Francisco, situada na cidade de Bragança Paulista, mediante questionário aprovado pela comissão de ética da referida instituição. Os voluntários selecionados não possuíam doenças sistêmicas e não faziam uso de antibióticos e drogas imunossupressoras nos últimos 4 meses. Para coleta do material foi utilizada

uma cureta metálica esterilizada, com a qual a amostra também foi semeada em um tubo de caldo Tioglicolato (Difco) e uma placa de ágar Mitis Salivarius (Difco). O ágar Mitis Salivarius foi posteriormente estriado com o auxílio de uma alça plástica descartável esterilizada e incubado a 37°C por 72 horas. O tubo com caldo Tioglicolato foi vigorosamente agitado em vórtex para promover a desagregação do inoculo e incubado por 18 horas a 37°C (Lancy, Jr. et al., 1980; Correia et al., 1995; Mouton, et al., 1980).

De oito a doze colônias de cada amostra, com morfologia característica para *Streptococcus* no ágar Mitis Salivarius (Difco), foram isoladas em ágar sangue Colúmbia (Difco) com eritrócitos de cavalo, sendo também verificado o tipo de hemólise (α , β ou gama). Foram consideradas suspeitas as colônias que se apresentaram com aproximadamente 1 mm de diâmetro, circulares, pouco convexas, lisas, opacas, azuis e cremosas (Mouton et al., 1980). As amostras que apresentaram alfa hemólise foram submetidas à prova da catalase e à coloração de Gram. Após estes dois testes, foram selecionadas como colônias suspeitas as que apresentaram resultado negativo para catalase e como característica tintorial se mostraram gram positivas, com morfologia de cocos isolados, aos pares e em cadeias curtas.

Dando seqüência à identificação, foram realizadas as provas bioquímicas e o teste de ligação bacteriana à amilase salivar.

As amostras identificadas presuntivamente como *Streptococcus crista* foram estocadas a -70°C. Para a estocagem foram acrescentados 33% de glicerol, como crioprotetor, a 1 ml de uma cultura da linhagem em caldo BHI, incubado a 37°C por 18 h (Sutton et al., 1994).

3.2- Testes de identificação bioquímica

Colônias de cocos gram positivos que apresentaram α -hemólise em ágar sangue Columbia (Difco), foram analisadas quanto às suas características bioquímicas, visando a identificação de *S. crista* (Handley et al., 1991).

O teste da catalase foi feito sobre uma lâmina de vidro adicionando 1 ml de água oxigenada (10V a 3%) (Nuclear) sobre uma porção da colônia suspeita, coletada de cultivo por 24 h a 37°C em ágar Cérebro Coração (Merck).

A produção de ácido a partir dos açúcares manitol, sorbitol, inulina, trealose, rafinose e lactose foi testada, de acordo com método descrito por Beighton et al., (1981), em um meio preparado por adição de 0,5% do substrato a um meio basal constituído de caldo Tioglicolato (Difco) (24g/l), sem dextrose ou indicador, e por caldo Púrpura Base (16 g/l) (apêndice) (Beigton et al., 1981; Kikuchi et al., 1995), incubado a 37°C por 72 h, também adicionado dos carboidratos acima (Mouton et al., 1980; Douglas et al., 1990).

No teste da hidrólise da esculina as amostras foram semeadas em ágar Bile Esculina (Difco), incubado por 24 a 48 h a 35°C. O aparecimento de colônias negras indicaram resultado positivo para hidrólise da esculina.

Para o teste da hidrólise da arginina foi utilizado meio base Descarboxilase (Base de Falkon) (apêndice). Após semeadura os tubos foram incubados por 4 a 7 dias a 37° C, com observação diária. Foram considerados negativos os tubos que apresentaram coloração amarela e positivos os que permaneceram com coloração roxa.

Depois de testada a habilidade da cepa de se ligar à amilase salivar (vide abaixo), para confirmação dos resultados obtidos e como forma de obter mais dados a respeito das amostras selecionadas como suspeitas, estas foram

testadas no sistema de identificação Vitek (bioMerieux), no laboratório de microbiologia do setor de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Pela dificuldade de uma identificação conclusiva de nossos isolados, fechando os testes bioquímicos, passamos a utilizar o kit de identificação BBL Crystal (Becton Dickinson), para gram positivos.

3.3- Teste de ligação à amilase salivar

Segundo metodologia de Douglas et al. (1990), este teste foi realizado incubando a amostra em 20 ml de caldo BHI (Oxoid) por 16 h a 37°C. As células foram centrifugadas e lavadas em tampão fosfato 50mM, pH 6,5, e ressuspensas em 50µl de saliva totalmente clarificada por centrifugação a 12.000 g por 5 minutos. Em todas as repetições deste teste a saliva foi obtida de um mesmo voluntário. A suspensão foi incubada à temperatura ambiente por 30 min antes de ser centrifugada a 12.000g por 3 min. Em poços na superfície de uma placa de amido-agarose a 1%, foram colocados 10µl do sobrenadante anteriormente obtido, para teste da atividade da amilase por difusão. A placa foi incubada por 3 h a 37°C e em seguida corada por solução de lugol. Regiões demonstrando atividade residual da amilase apresentaram um halo claro, não corado, provando que o amido foi desdobrado pela atividade amilásica. As regiões onde não houve atividade da amilase ficam coradas em roxo escuro, mostrando que não houve desdobramento do amido.

3.4-Extração de DNA genômico:

O DNA genômico bacteriano foi isolado de acordo com método descrito por Ausubel et al. (1988), a partir de aproximadamente 5 ml de crescimento bacteriano por 18 horas em caldo BHI (Oxoid). A suspensão celular foi centrifugada a temperatura ambiente a 12.000g por 5 minutos e o precipitado lavado duas vezes com tampão TE (apêndice).

Ao precipitado seco foram adicionados 200µl de tampão TE, 50 µl de lisozima (Sigma) a 10 mg/ml e 10µl de Rnase (Sigma) a 10 mg/ml. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e incubada a 37°C por 18 horas. Foi adicionada uma mistura de 70µl de SDS (sódio lauril sulfato) a 10% e 5 µl de proteinase K (sigma) a 10 mg/ml. Depois de homogeneizada em vórtex, a suspensão foi incubada a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 100µl de NaCl 5M e a mesma quantidade de uma solução pré-aquecida a 65°C de CTAB/NaCl. A suspensão, assim obtida, foi agitada em vórtex até a formação de um líquido de aspecto leitoso e incubada a 65°C por 10 minutos. Após este procedimento foram adicionados 750µl de uma solução de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1) (v/v) e a mistura agitada em vórtex por cerca de 10 segundos. Depois disso o material foi centrifugado a 12000g. O sobrenadante aquoso foi cuidadosamente transferido para outro tubo de reação e o DNA genômico precipitado com 0,6 volumes de isopropanol (Merck) a -20° C e a mistura mantida à temperatura de -20°C por 30 minutos.

Após este período a solução foi centrifugada a 1200g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado duas vezes por centrifugação, com solução de etanol (Merck) 70°GL a -20° C. Após tal processo, o DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso com

movimentos cuidadosos e circulares em 100µl de tampão TE pH 8,0. Depois de ressuspensão o DNA foi mantido a -4°C por 18 horas para solubilização.

A dosagem de DNA realizou-se como descrito por Sambrook et al. (1989), em que a concentração e pureza do DNA foram determinadas a partir de leitura em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. Para isso o seguinte cálculo foi realizado:

Concentração de DNA (µg/µl) = A_{260nm} X 50 X fator de diluição

Pureza do DNA = A₂₈₀/A₂₆₀ (foram utilizados aqueles que apresentaram valores entre 1,5 a 2,0, sem contaminação por RNA ou proteínas)

O ácido nucleico extraído foi conservado à temperatura de -20°C.

3.5 – Teste de RAPD (análise da amplificação ramdomica do DNA polimórfico) para identificação com uso de iniciadores específicos (AP-PCR)

Tendo por objetivo analisar as amostras por nós isoladas como prováveis *S. crista*, o teste de AP-PCR foi utilizado, segundo a técnica de Menard & Mouton, (1993), com algumas modificações descritas por Rudney & Larson, (1999).

O teste foi realizado utilizando-se o DNA extraído pelo método anteriormente descrito. Os demais reagentes utilizados e suas respectivas quantidades, encontram-se descritos na tabela II:

Tabela II – Descrição dos reagentes empregados no teste de AP-PCR.

Componentes	Volume	Concentração final
Água milli-Q estéril - QSP	50 µl	_____
10 X “PCR Buffer” (Gibco-BRL)	5 µl	1 X
10 mM “dNTP mixture” (Gibco-BRL)	1 µl	0,2 mM
Iniciador RR2	_____	11 µg/ml
Iniciador 434	_____	8,25 µg/ml
50 mM MgCl ₂ (Gibco – BRL)	1,5 µl	1,5 mM
DNA – amostras	1 µl	0,02-0,09µg/µl
Taq – DNA Polimerase (5U) (Gibco – BRL)	0,25 µl	1,25 U
Total	50 µl	_____

Na execução do teste os reagentes foram colocados em um tubo tipo “ependorf”, de 500µl, de acordo com as quantidades indicadas na tabela acima. Antes da adição da Taq - DNA polimerase a mistura foi aquecida a 95°C por 5 minutos a fim de desfazer as ligações inespecíficas dos iniciadores; depois disso, foi adicionada a enzima.

Segundo recomendação de Rudney & Larson, (1999), foram utilizados dois iniciadores, o RR2 e o 434. O iniciador RR2, de acordo com este autor, é capaz de diferenciar o *Streptococcus crista* dos demais *Streptococcus* deste grupo, a não ser o *Streptococcus sanguis*. Por isso foi também utilizado o iniciador 434, que é capaz de diferenciar estas duas espécies. Os iniciadores citados correspondem às seguintes sequências:

RR2 - 5' AAG AGA GGAG CTA GCT CTT CTT GGA 3'

434 - 5' GCA CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC 3'

Preparado deste modo, o material foi submetido a 40 ciclos térmicos, em um Termociclador (MJ Reseach Modelo PTc – 150-16 USA) nas seguintes condições:

4 Ciclos de:

- 94°C – 5 minutos - Desnaturação
- 30°C – 5 minutos – Anelamento
- 72°C – 5 minutos – Extensão

35 Ciclos de:

- 94°C – 1 minuto – Desnaturação
- 30°C – 1 minuto – Anelamento
- 72°C – 2 minutos – Extensão

1 Ciclo de:

- 72°C – 5 minutos – Extensão

Para observação do produto amplificado, foi utilizada eletroforese em gel de agarose (Gibco) a 2%, preparado em tampão TBE (apêndice), com a corrida eletroforética a 75 V. Na corrida eletroforética foi usado um marcador de peso molecular (1 Kb Ladder – Gibco BRL), com a finalidade de comparação do peso molecular do fragmento amplificado. Após a corrida, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (Gibco- BRL) (0,5µg/ml) por aproximadamente 20 minutos e observados em um Transiluminador (Ultra Violet Products).

3.6 – Reação em cadeia da polimerase - PCR

O teste de PCR foi realizado pelo Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo, com as 8 amostras por nós isoladas e teve o objetivo de confirmar a identificação obtida nos testes anteriormente realizados. Neste experimento foram utilizados os iniciadores SRP003 e SRP004, capazes de amplificar um fragmento de gene de 820pb, encontrado apenas em amostras de *S. crista* e em uma cepa de *S. oralis*. Os iniciadores citados correspondem às seqüências abaixo os quais amplificam um fragmento gênico que, quando presente, confirma se tratar de *S. crista*, mas um resultado negativo neste teste não exclui esta possibilidade.

Os iniciadores citados tem as seguintes seqüências:

SRP003 – 5' – CCG GAT CCT CTC CAG AAA CAA GTG GTC GT –3'

SRP004 – 5' – CCG AAT TCT AGT GGT TCA GGG GAA GGA A – 3'

Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão foram os seguintes:

1 ciclo de:

94°C por 2 minutos – Desnaturação

30 ciclos de:

94°C por 1 minuto – Desnaturação

60°C por 2 minutos – Anelamento

72°C por 3 minutos – Extensão

Pelo fato de resultados com estes iniciadores ainda não terem sido publicados pelo autor, outros detalhes a respeito deste método podem ser obtidos através de comunicação pessoal com o Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo.

3.7- Análise da Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD):

Este método consiste em uma análise do DNA polimórfico baseado na técnica de PCR, diferindo desta por consistir na amplificação do DNA genômico utilizando um conjunto de três iniciadores monocatenários com uma seqüência arbitrária de nucleotídeos. Tendo sido descrita inicialmente por Williams et al., (1990), nesta técnica são utilizados iniciadores que detectam polimorfismo na ausência de seqüências específicas de nucleotídeos, de forma que estes polimorfismos funcionam como marcadores genéticos e podem ser usados na construção de dendrogramas.

Foi tomado como base para execução deste teste, o protocolo recomendado por Williams et al., (1990). Os iniciadores randômicos (com 10 pb) utilizados foram adquiridos da Operon Technologies.

As reações de amplificação foram realizadas em tubos de 200µl, num volume final de 50µl, contendo 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0,3µM de iniciador, 10ng de DNA cromossômico e 1,5 unidades de Taq polimerase (Gibco BRL). Um termociclador (Applied Biosystems – PCR System 9700) foi utilizado para as amplificações, sendo programado inicialmente para um ciclo de 94°C por 10 min, para uma completa desnaturação. Em seguida, foram realizados ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, de acordo com o iniciador selecionado, nas seguintes condições:

OPR 2 e 8

45 ciclos de:

- 94°C – 1 minuto - Desnaturação
- 33°C – 1 minuto – Anelamento
- 72°C – 2 minutos – Extensão

OPR 13

45 Ciclos de:

- 94°C – 1 minuto – Desnaturação
- 30°C – 1 minuto – Anelamento
- 72°C – 2 minutos – Extensão

Tabela III – Descrição dos reagentes empregados no teste de RAPD.

Componentes	Volume	Concentração final
Água milli-Q estéril - Qsp	50 µl	_____
10 X “PCR Buffer” (Gibco-BRL)	5 µl	1 X
10 mM “dNTP mixture” (Gibco-BRL)	1 µl	0,2 mM cada
Iniciador OPR 2, 8 e 13	1 µl	_____
50 mM MgCl ₂ (Gibco – BRL)	1,5 µl	1,5 mM
DNA – molde	1 µl	0,02-0,09µg/µl
Taq – DNA Polimerase (5U) (Gibco – BRL)	0,25 µl	1,25 U
Total	50 µl	_____

Após a reação, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal, em gel de agarose (Gibco) a 1,5%, sendo utilizado como tampão de corrida o TBE (apêndice). Na corrida eletroforética foi colocado um marcador de peso molecular (1 Kb Ladder – Gibco BRL) para comparação do peso molecular do fragmento amplificado. As bandas foram visualizadas como descrito anteriormente.

3.7.1. Escolha dos iniciadores

Foram testados 20 iniciadores do kit R, conforme descrição a seguir, sendo selecionados os OPR2, OPR8 e OPR13, que geraram um maior número de polimorfismos e um bom padrão de amplificação, sendo escolhidas para tal as amostras padrão de *Streptococcus crista* e algumas das isoladas.

Tabela IV - Lista de iniciadores do kit R e suas seqüências, testados para realização do teste de RAPD para caracterizar a correlação entre as diferentes amostras de *S. crista*.

SEQUÊNCIA	INICIADORES
5' TGC GGG TCCT 3'	OPR -01
5' CAC AG CTGCC 3'	OPR-02
5' ACACAGAGGG 3'	OPR -03
5' CCCGTAGCAC 3'	OPR -04
5' GACCTAGTGG 3'	OPR -05
5' GTCTACGGCA 3'	OPR -06
5' ACTGGCCCTGA 3'	OPR -07
5' CCCGTTGCCT 3'	OPR -08
5' TGAGCACGAG 3'	OPR -09
5' CCATTCCCCA 3'	OPR -10
5' GTAGCCGTCT 3'	OPR -11
5' ACAGGTGCGT 3'	OPR -12
5' GGACGACAAG 3'	OPR -13
5' CAGGATTCCC 3'	OPR -14
5' GGACAACGAG 3'	OPR -15
5' CTCTGCGCGT 3'	OPR -16
5' CCGTACGTAG 3'	OPR -17
5' GGCTTTGCCA 3'	OPR -18
5' CCTCCTCATC 3'	OPR -19
5' ACGGCAAGGA 3'	OPR -20

3.8- Microscopia Eletrônica para visualização do tufo de fibrilas

Este teste foi realizado como recomendado por Handley et al. (1991), com algumas modificações. As linhagens bacterianas cresceram por 18h em caldo BHI (Oxoid), a 37°C e foram centrifugadas a 1500 rpm, lavadas três vezes em solução salina 3% - sacarose 1% e o precipitado obtido foi resuspenso em um mesmo volume desta solução. Telas de cobre (grid), cobertas por um filme de Formvar, foram recobertas por carbono em um evaporador de carbono Bal-Tec, modelo 020. A tela de cobre foi colocada sobre uma gota da suspensão celular, com a face do filme voltada para a mesma, durante dois minutos. Depois de retirar o excesso de líquido encostando sua extremidade em um papel absorvente, a tela de cobre ficou secando por duas horas dentro de uma placa de Petri fechada, com o filme voltado para cima. Decorrido este tempo a tela de cobre foi colocada por dois minutos sobre uma gota de solução a 2% de acetato de uranila duas vezes hidratado (Laboratório Riedel-deHaën, Alemanha). Posteriormente, o excesso de líquido foi retirado com o auxílio de um papel de filtro absorvente e a tela seca durante 18 horas, sobre um papel de filtro, com o filme voltado para cima, fechada em uma placa de Petri.

As telas de cobre foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (LEO 906, Carl Zeiss).

3.9- Adesão em células HEp-2 e KB

As células foram mantidas em meio Eagle (Apêndice) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (50% de penicilina e 50% de estreptomicina) (Apêndice) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Depois disso, a monocamada celular formada foi tripsinizada, ajustada a aproximadamente 5x10⁵ células por ml e colocada em placas de cultura de 24 concavidades (Falcon, USA), com 1 ml do meio Eagle acrescido do soro bovino fetal e de antibióticos, por concavidade. Em cada orifício da placa foram colocadas previamente lamínulas redondas esterilizadas de 13 mm de diâmetro.

O acompanhamento do crescimento das monocamadas de células foi feito após 24-48 horas em microscópio invertido. Havendo crescimento de camada semi-confluenta (com 50% ou mais de área recoberta), desde que as células se apresentassem aparentemente normais (baixa refringência e sem deslocamento), a cultura era considerada ideal para o teste de adesão.

Ao atingir estas condições, o meio Eagle dos orifícios da placa de cultura foi cuidadosamente retirado com o auxílio de micropipetas de 1000 µl e ponteiros esterilizados. As células foram posteriormente lavadas 3 vezes com PBS 0,01M esterilizado (pH7,4) (Apêndice), para retirar resíduos de soro fetal bovino e antibióticos. Após estes procedimentos, a cada orifício da placa, foi adicionado 1 ml de meio Eagle e inoculados 50µl de uma cultura com 18 horas a ser testada. Todos os testes foram realizados em duplicata e incluídos neles uma amostra controle positivo para adesão de *Escherichia coli* E2348/69, uma amostra controle negativo para adesão de *Escherichia coli* (K12C600) e amostras controle positivas de *S. crista* CR3, CR311 e

CC5AWT, além das oito amostras isoladas. As linhagens celulares utilizadas foram HEP-2 (ATCC HB-8065) e KB (ATCC CCL-17).

As monocamadas infectadas foram incubadas por 3 h a 37°C, sendo então lavadas 10 vezes com PBS 0,01M esterilizado (pH 7,4) para remoção de bactérias não aderidas. Após a lavagem, as lamínulas foram fixadas pela adição de 1 ml de metanol P.A. (Merck) por orifício, durante um tempo mínimo de 15 minutos e, em seguida, coradas por 10 minutos com May-Grunwald (Apêndice) diluído em tampão Sorensen (Apêndice), na proporção de 1:2. Em seguida a monocamada foi corada, com Giemsa (Apêndice) diluído em tampão Sorensen na proporção de 1:5 por 10 minutos. As lamínulas foram então lavadas duas vezes com água destilada.

As lamínulas foram secas e observadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão. Para a realização deste teste a metodologia usada foi aquela preconizada nos trabalhos de Scalestky et al.,(1988) e Stinson et al., (1998) e Tokuda et al., (1996), apesar destes trabalhos não testarem adesão com o *Streptococcus crista*.

3.10- Adesão em raspado de células bucais:

Para a realização deste teste foi adotada a técnica descrita por St.Geme & Cutter (1996) com várias modificações.

Inicialmente a boca do doador foi lavada 3 vezes com água e uma primeira raspagem suave foi realizada na mucosa julgal, com o auxílio de uma colher ou espátula esterilizada. A boca foi lavada duas vezes, por 1 minuto com solução de clorexidina a 0,12% (Periogard-Colgate) em seguida uma vez com água. Células da mucosa julgal foram coletadas por meio de raspagem com uma espátula esterilizada. O raspado foi removido da espátula por meio

de lavagem com PBS 0,01M pH 7,4 (Apêndice) e ressuspensão em 3 a 4 ml da mesma solução contendo 2% de antibióticos (50% penicilina, 50% estreptomicina) (Apêndice). As células foram lavadas 2 vezes em centrífuga (NT-801, Nova Técnica) a 1200 rpm por 2 minutos, ressuspensas na mesma solução e incubadas a 37°C por 30 minutos para eliminação da microbiota remanescente. Após tal período as células foram lavadas 2 vezes nas mesmas condições exceto pela utilização de PBS sem antibiótico. O sedimento celular foi ressuspensão em 200µl da mesma solução de PBS. Foram adicionados 20µl da suspensão celular a 10µl de uma suspensão bacteriana a 10⁶ cel/ml e incubados a 37° C por 30 minutos a 1 hora.

Decorrido este tempo foi feito um esfregaço de todo o conteúdo, que foi seco ao ar e posteriormente fixado na chama e com metanol (Merck).

O esfregaço foi corado com a coloração de Wright que consiste em cobrir a lâmina com o corante de Wright (Apêndice) e aguardar 3 minutos; decorrido este tempo foram adicionadas algumas gotas de água destilada sobre o corante e aguardou-se mais 5 minutos antes de lavar a lâmina em água corrente e secá-la em um papel absorvente.

A observação das lâminas foi feita ao microscópio óptico (Olympus – B201), em um aumento de 1000 vezes sob imersão. Foram avaliadas 100 células por lâmina.

3.11 – Teste de Coagregação

A técnica utilizada neste teste foi descrita por Cisar et al. (1979) com algumas modificações sugeridas por Handley et al. (1985).

A *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 foi cultivada em caldo BHI (Merck) por 5 dias a 37° C, em condições de anaerobiose. As amostras de *S.*

crista padrão e amostras isoladas e de *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b foram cultivadas em um meio complexo contendo 0,5% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de glicose, 0,5% de K_2HPO_4 e 0,05% de Tween 80 em pH 7,5. As culturas foram incubadas a 37° C por dois dias. Depois disso as culturas de *F. nucleatum* e *Streptococcus* foram centrifugadas e lavadas 3 vezes e ressuspensas em tampão de coagregação (Apêndice). As suspensões foram ajustadas a uma densidade óptica de 1,5 com absorvância de 660 nm. Volumes iguais (0,2 ml) da suspensão de trabalho foram colocados em um tubo e misturados em um agitador orbital por 2 minutos e depois deixadas em repouso, à temperatura ambiente por uma hora. O tubo foi então cuidadosamente agitado com leves pancadas e o grau de coagregação foi lido visualmente.

Tubos controle foram feitos com 0,2 ml de suspensão bacteriana e 0,1 ml de tampão de coagregação.

O grau de coagregação foi classificado de 0 a 4 da seguinte forma:

Grau 0 → ausência de coagregados visíveis em suspensão

Grau 1 → poucos coagregados uniformes em suspensão

Grau 2 → coagregados bem definidos, facilmente visíveis, mas a suspensão permanece turva, sem imediato assentamento dos coagregados

Grau 3 → muitos coagregados, com algum assentamento, apesar da maioria permanecer em suspensão

Grau 4 → muitos coagregados que se assentam rapidamente deixando o sobrenadante claro

4 – Resultados

4-1- Amostras bacterianas selecionadas e testes bioquímicos

As colônias selecionadas como suspeitas de se tratarem de *S. crista* nos testes anteriormente citados, ou seja, aquelas que se apresentaram com alfa hemólise, catalase negativa, crescimento negativo em ágar Bile Esculina, gram positivas e com morfologia celular e arranjo característicos, foram submetidas ao teste de produção de ácido a partir da fermentação de açúcares e ao teste de ligação à amilase salivar. De acordo com as características bioquímicas, as colônias suspeitas foram testadas nos kits Vitek (bioMerieux) e BBL Crystal (Becton Dickinson).

As amostras isoladas, C1 a C8, foram isoladas de pacientes doadores voluntários com idade entre 20 e 40 anos, do sexo feminino e com acúmulo variável de biofilme bacteriano.

No sistema de identificação Vitek (bioMerieux) todos os isolados, de C1 a C8 foram identificados como *Streptococcus constellatus*. Este resultado se deve ao fato deste sistema não incluir o *S. crista* entre as espécies que se propõe a identificar. As amostras selecionadas no teste anterior foram submetidas ao sistema comercial de identificação “BBL Crystal – Gram positive (Becton Dickinson)” no qual as amostras C1 a C8 foram identificadas como *S. crista*.

4.2 – Teste de RAPD para identificação com iniciadores específicos (AP – PCR)

Todas as cepas isoladas neste trabalho (C1 a C8), além das três amostras padrão de *S. crista* e uma amostra padrão de *Streptococcus sanguis*, foram submetidas ao AP-PCR com os iniciadores RR2 e 434.

O resultado das amplificações pode ser visualizado nas figuras 1 e 2 a seguir, que correspondem respectivamente aos iniciadores RR2 e 434.

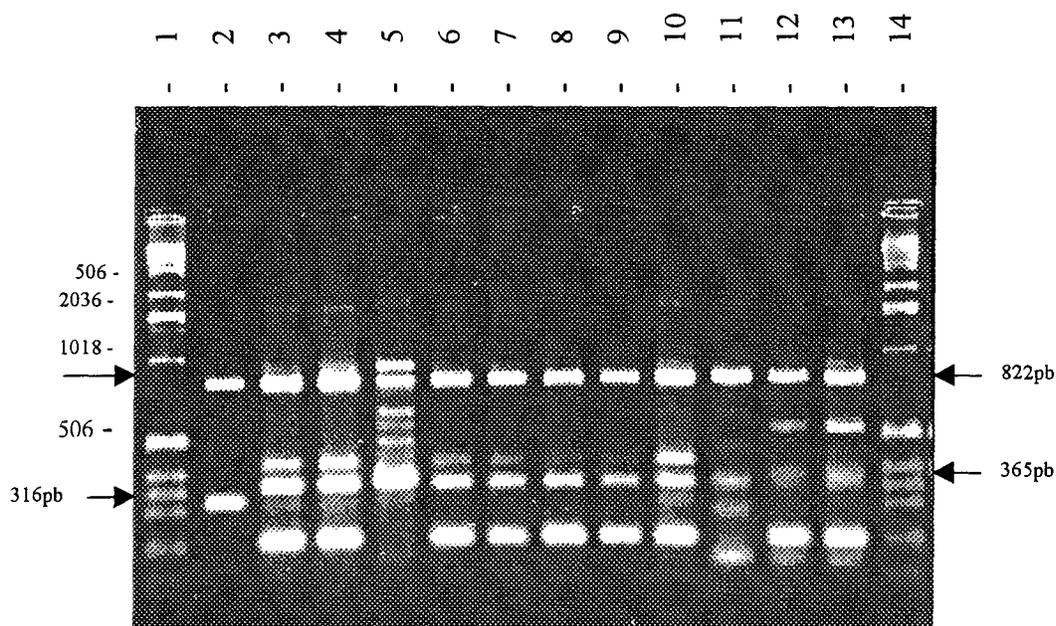


Figura 1- Gel de agarose a 2% com padrões de banda obtidos a partir da amplificação obtida das amostras padrão de *S. sanguis*, *S. crista* (CR3, CR311 e CC5AWT) e C1 a C8, com o iniciador RR2. (1; 14): padrão de peso molecular 100kb (Gibco); (2): amostra *S. sanguis*; (3): amostra CR3; (4): amostra CR311; (5): amostra CC5AWT; (6): amostra C1; (7): amostra C2; (8): amostra C3; (9): amostra C4; (10): amostra C5; (11): amostra C6; (12): amostra C7; (13): amostra C8.

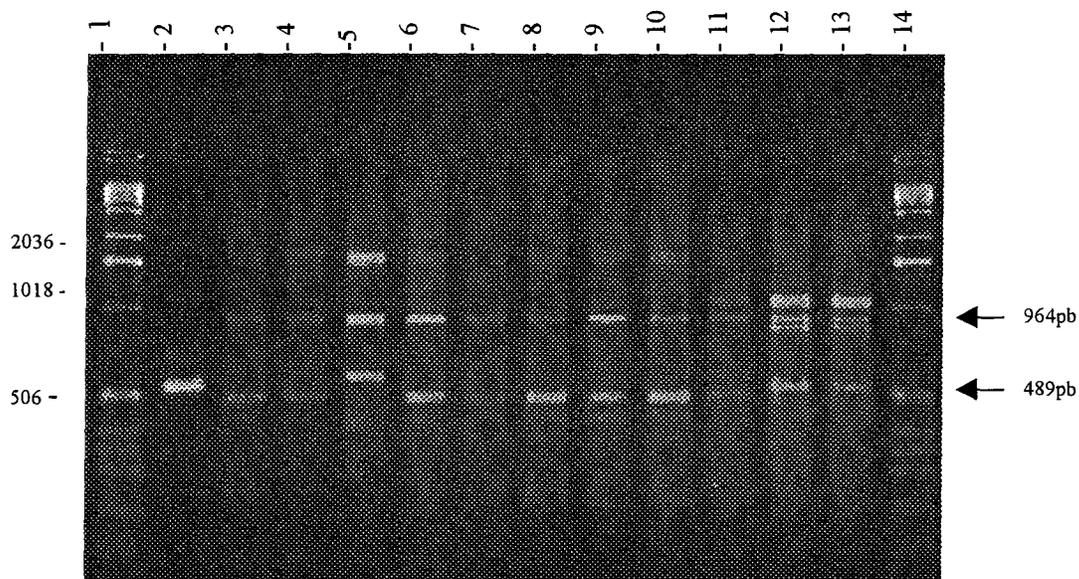


Figura 2- Gel de agarose a 2% com os padrões de banda obtidos a partir da amplificação obtida das amostras padrão de *S. sanguis*, *S. crista* (CR3,CR311 e CC5AWT) e C1 a C8 isoladas, com o iniciador 434. (1; 14): padrão de peso molecular 100kb (Gibco); (2): amostra *S. sanguis*; (3): amostra CR3; (4): amostra CR311; (5): amostra CC5AWT; (6): amostra C1; (7): amostra C2; (8): amostra C3; (9): amostra C4; (10): amostra C5; (11): amostra C6; (12): amostra C7; (13): amostra C8.

4.3 – Análise da amplificação randômica do DNA polimórfico - RAPD

De acordo com a descrição anterior, foram testadas duas amostras de *Streptococcus suis* (*S. suis* 2 e 527), seis amostras de estreptococos orais, nossas três amostras padrão de *S. crista* e as oito amostras isoladas por nós, C1

a C8. As amostras de estreptococos orais correspondem a duas amostras de *Streptococcus parasanguis* (PSH1a e PSH1b) e amostras de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*.

O padrão de bandas obtido das ampliações pode ser visualizado nas figuras 3, 4 e 5 a seguir, que correspondem respectivamente aos iniciadores OPR2, OPR8 e OPR 13. Estes três iniciadores foram selecionados como os mais adequados do Kit R por terem apresentado maior número de bandas amplificadas.

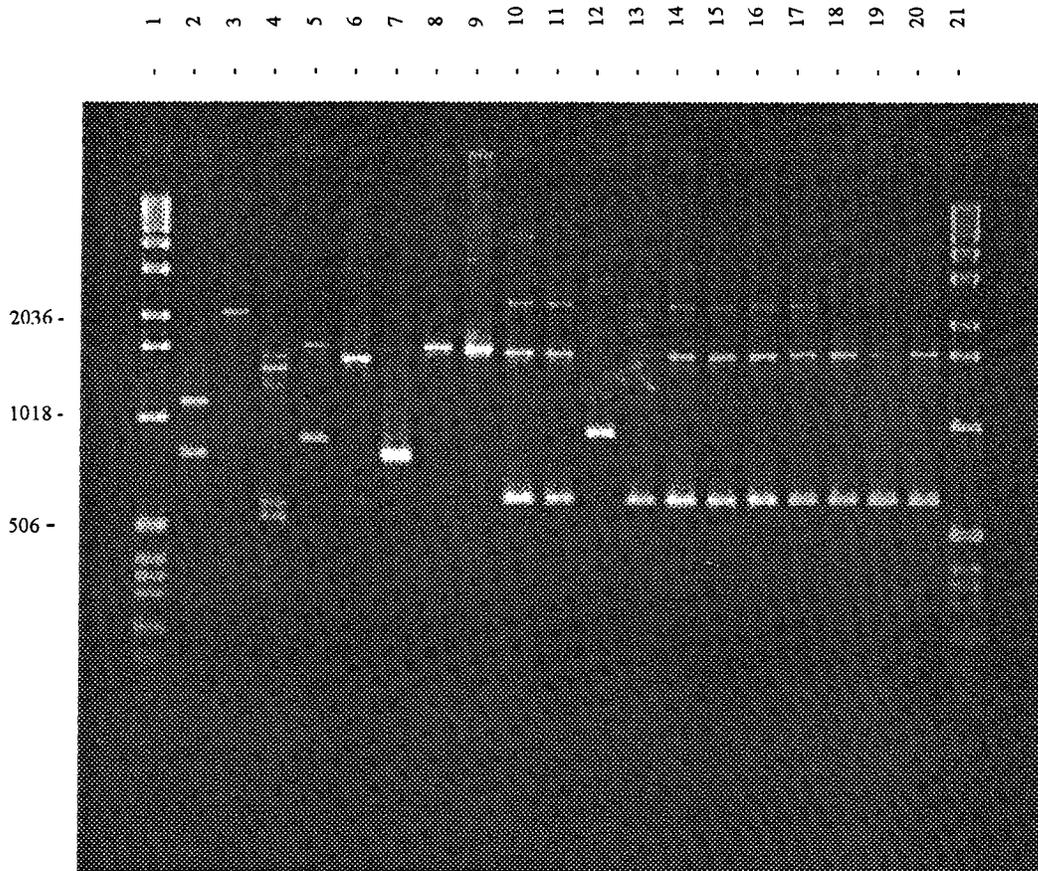


Figura 3 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR2 com as amostras padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 isoladas. (1; 21): padrão de peso molecular 100kb (Gibco); (2): amostra *S. suis* 527; (3): amostra *S. suis* 2; (4): amostra *S. sanguis*; (5): amostra *S. mitis*; (6): amostra *S. oralis*; (7): amostra *S. gordonii*; (8): amostra *S. parasnaguis* PSH1a; (9): amostra *S. parasnaguis* PSH1b; (10): amostra *S. crista* CR3; (11): amostra *S. crista* CR311; (12): amostra *S. crista* CC5AWT; (13): amostra C1; (14): amostra C2; (15): amostra C3; (16): amostra C4; (17): amostra C5; (18): amostra C6; (19): amostra C7; (20): amostra C8.

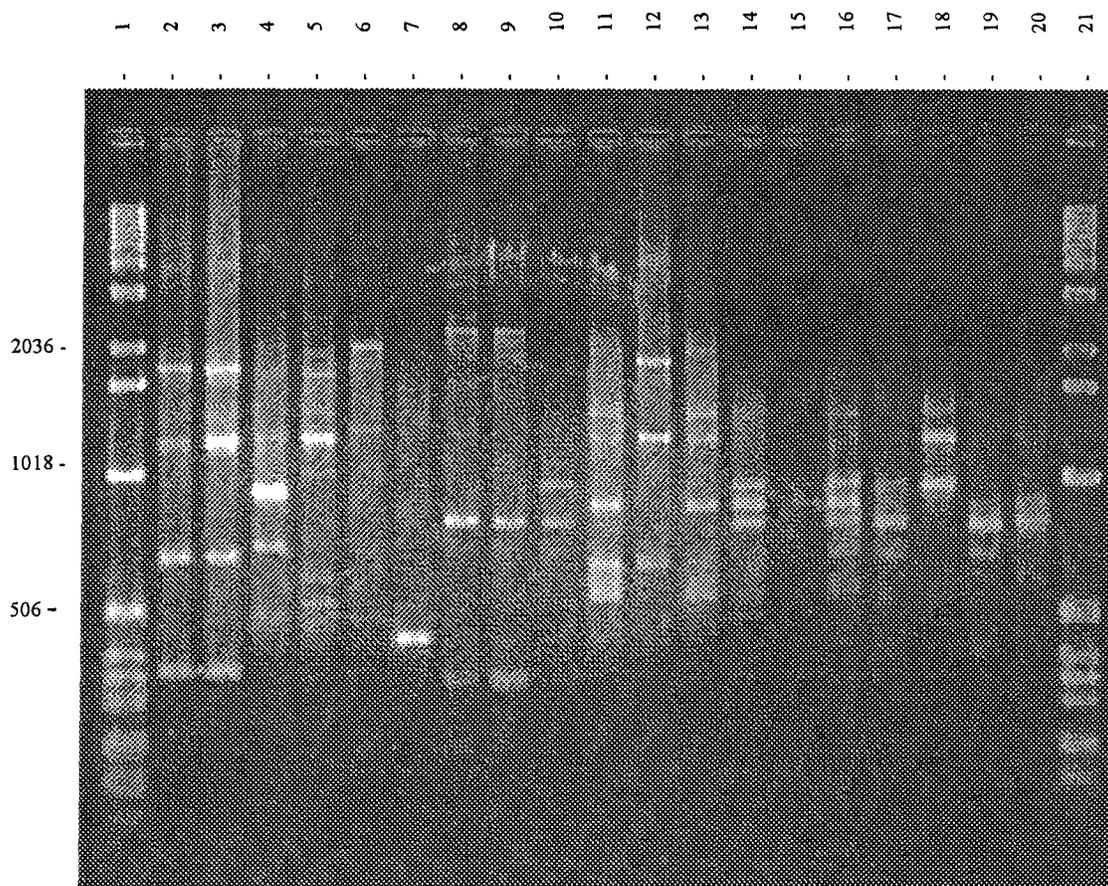


Figura 4 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR8 com as amostras padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 isoladas. (1; 21): padrão de peso molecular 100kb (Gibco); (2): amostra *S. suis* 527; (3): amostra *S. suis* 2; (4): amostra *S. sanguis*; (5): amostra *S. mitis*; (6): amostra *S. oralis*; (7): amostra *S. gordonii*; (8): amostra *S. parasanguis* PSH1a; (9): amostra *S. parasanguis* PSH1b; (10): amostra *S. crista* CR3; (11): amostra *S. crista* CR311; (12): amostra *S. crista* CC5AWT; (13): amostra C1; (14): amostra C2; (15): amostra C3; (16): amostra C4; (17): amostra C5; (18): amostra C6; (19): amostra C7; (20): amostra C8.

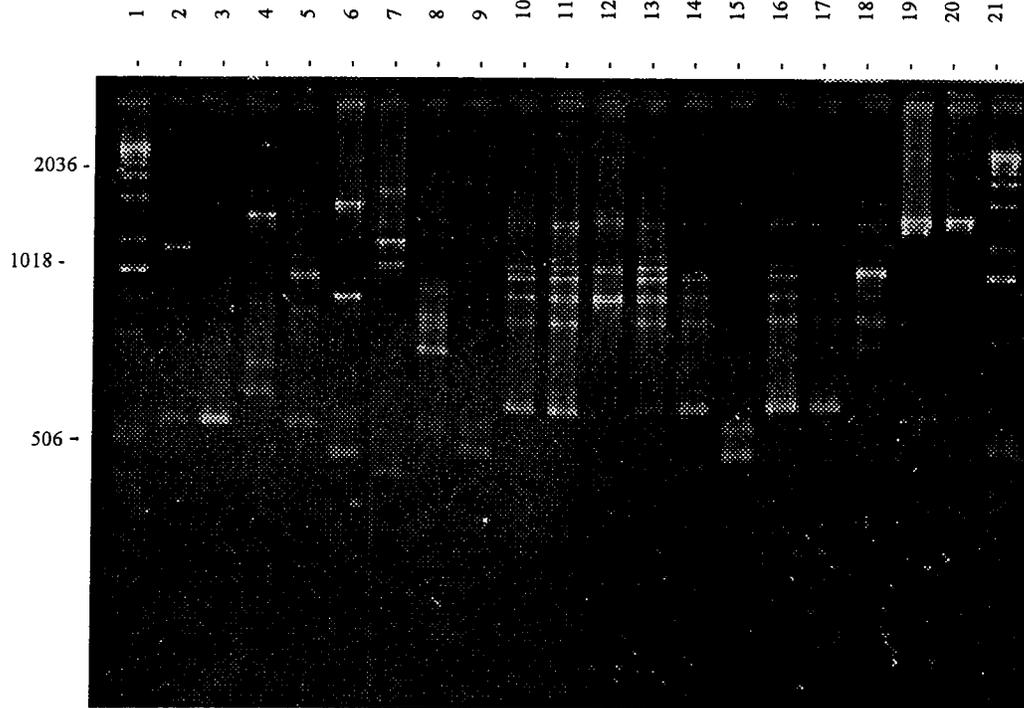


Figura 5 – Gel de agarose a 1,5% com as amplificações obtidas usando o iniciador OPR13 com as amostras padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 isoladas. (1; 21): padrão de peso molecular 100kb (Gibco); (2): amostra *S. suis* 527; (3): amostra *S. suis* 2; (4): amostra *S. sanguis*; (5): amostra *S. mitis*; (6): amostra *S. oralis*; (7): amostra *S. gordonii*; (8): amostra *S. parasanguis* PSH1a; (9): amostra *S. parasanguis* PSH1b; (10): amostra *S. crista* CR3; (11): amostra *S. crista* CR311; (12): amostra *S. crista* CC5AWT; (13): amostra C1; (14): amostra C2; (15): amostra C3; (16): amostra C4; (17): amostra C5; (18): amostra C6; (19): amostra C7; (20): amostra C8.

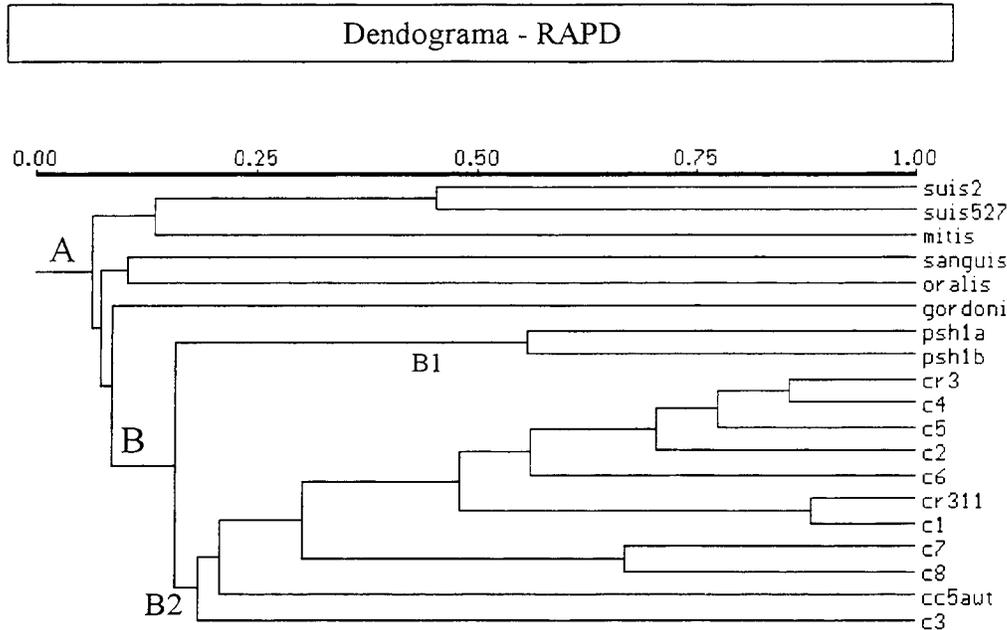


Figura 6 – Dendrograma obtido na análise clonal pelo teste de RAPD, baseado no UPGMA (unweighted pair group method using average linkages) usando o coeficiente de Jacard, com as seguinte amostras: padrão de *S. suis* 2 e 527, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasnaguis* PSH1a e PSH1b, *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT e as amostras C1 a C8 isoladas.

4.4 – Reação em cadeia da polimerase - PCR

Utilizando os iniciadores SRP003 e SRP004, as amostras C1, C3, C7 e C8, amplificaram o gene pesquisado, enquanto que as amostras C2, C4, C5 e C6, não amplificaram. Pelo fato do gene amplificado ser encontrado

exclusivamente em *S. crista* e em uma linhagem de *Streptococcus oralis* com tufo de fibrilas este resultado confirma que as quatro primeiras amostras são *S. crista*, mas não descarta que as outras quatro também o sejam.

A figura 07 mostra as bandas de 820 pb obtidas a partir das ampliações dos iniciadores citados, com a amostra padrão de *S. crista* CC5AWT e as amostras C1 a C8 isoladas.

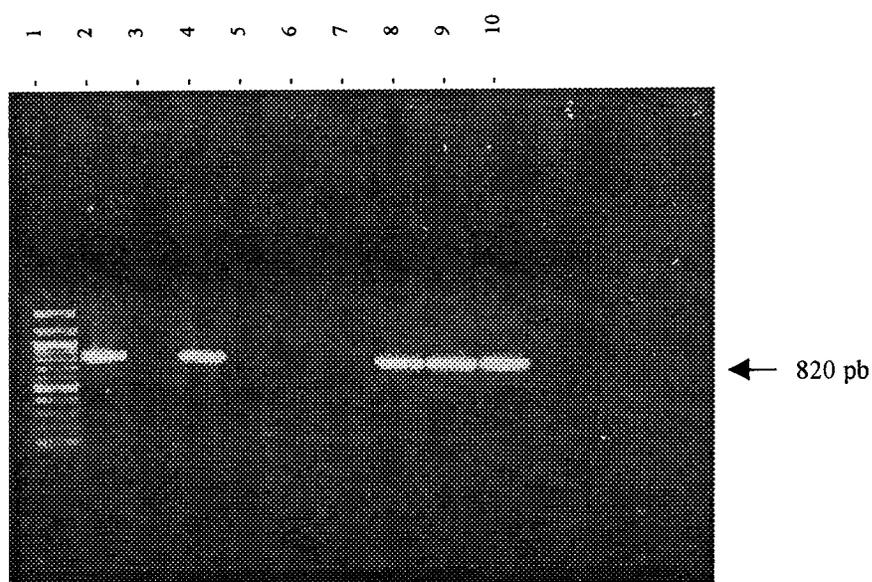


Figura 07 – Gel de agarose com as ampliações obtidas das amostras por nós isoladas C1 a C8 e da amostra padrão de *S. crista* CC5AWT, com os iniciadores SRP003 e SRP004. As bandas do marcador de peso molecular correspondem a 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 900, 1000, 1200 e 1500 pb. (1): padrão de peso molecular; (2): amostra C1; (3): amostra C2; (4): amostra C3; (5): amostra C4; (6): amostra C5; (7): amostra C6; (8): amostra C7; (9): amostra C8; (10): amostra CC5AWT.

4.5-Microscopia eletrônica para visualização do tufo de fibrilas

As amostras isoladas foram submetidas à coloração negativa para avaliação da presença de fibrilas e seu arranjo na superfície da célula bacteriana: peritríqueas ou fibrilas lateralmente localizadas (tufo de fibrilas).

Todas as amostras isoladas, da mesma forma que as amostras padrão CR3, CR311 e CC5AWT, demonstraram tufo de fibrilas lateralmente localizadas, conforme mostram as figuras 8, 9 e 10.

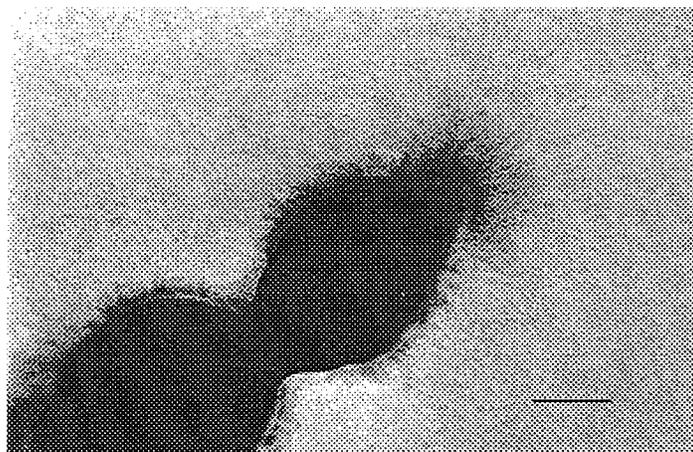


Figura 8 – Micrografia eletrônica de tufo de fibrilas observado na amostra padrão de *S. crista* CC5AWT, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 16700 vezes. Barra = 149,7 nm

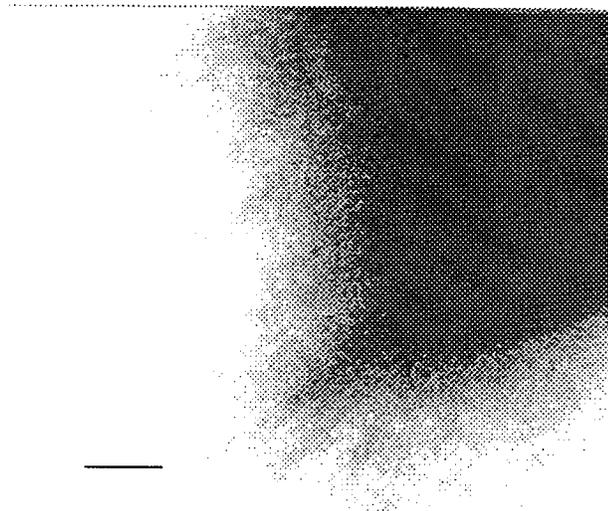


Figura 9 – Fotografia de tufo de fibrilas observado na amostra isolada C2, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 161865 vezes. Barra = 60,97 nm



Figura 10 – Fotografia de tufo de fibrilas observado na amostra isolada C8, obtida pela técnica de coloração negativa. Observação em microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 83400 vezes. Barra = 120 nm

4.6- Adesão em células HEp-2 e KB

O teste de adesão em células foi realizado como anteriormente descrito. Utilizou-se para realização deste teste o tempo de 3 horas de adesão a 37° C, com um inóculo de 50µl de uma cultura com 18 horas de crescimento em caldo BHI. Este tempo e volume foram selecionados como mais adequados para a maioria das amostras, pois observamos que muitas delas destruíram parcial ou totalmente o tapete de células da lâmina quando utilizamos um maior volume de cultura ou tempo de adesão.

Todas as nossas amostras padrão de *S. crista* e as por nós isoladas, C1 a C8, apresentara um padrão de adesão negativo às células HEp-2, assim como às células KB.

4.7- Adesão em raspado de células bucais:

Assim como os anteriores, este teste foi realizado com as amostras padrão CR3, CR311 e CC5AWT e com as amostras C1 a C8. Foi considerada adesão positiva quando observados valores superiores a 40% ou mais de bactérias aderidas às células que em outras regiões da lâmina. Devido ao fato de neste método não ser realizada a lavagem para remoção das bactérias não aderidas, precisamos comparar o número de bactérias não associadas às células com aquele associado.

Todas as amostras testadas, da mesma forma que as amostras padrão, apresentaram aderências às células bucais. O padrão de adesão obtido pode ser observado na figura 11 e 12.

4.9 – Teste de Coagregação

De acordo com a metodologia já citada anteriormente, este teste foi realizado com nossas amostras padrão de *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT, com as amostras padrão de *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b e com nossas amostras isoladas C1 a C8, no intuito de verificar seu grau de coagregação com a *F. nucleatum*.

Os resultados obtidos estão expostos na tabela V:

Tabela V - Resultado da coagregação das amostras padrão de *S. crista* CR3, CR311 e CC5AWT, amostras padrão de *S. parasanguis* PSH1a e PSH1b e amostras isoladas C1 a C8, com a *F. nucleatum*.

Amostra	Grau de coagregação
PSH1a	0
PSH1b	0
CR3	3
CR311	3
CC5AWT	2
C1	0
C2	0
C3	0
C4	0
C5	0
C6	3
C7	3
C8	0

5 – Discussão:

Apesar de nesse estudo se ter trabalhado com 87 amostras de biofilme bacteriano, foram obtidas somente 8 isolados que foram identificadas como *S. crista* pelas características apresentadas. O fato de ter sido obtida uma baixa incidência de linhagens de *S. crista* nas amostras estudadas pode ser devido a dificuldades encontradas na identificação e padronização dos testes. Por este motivo, talvez seja possível obter uma maior incidência de isolamento em trabalhos posteriores. Outra hipótese a ser considerada é que esta espécie esteja realmente em pequena concentração no biofilme dental.

Em uma primeira fase, a identificação foi feita utilizando testes bioquímicos convencionais preparados no laboratório e, em uma fase posterior, foram realizados testes confirmatórios e complementares utilizando kits comerciais para identificação bacteriana. No início do trabalho foram utilizados os kits Api 20 Strep (bioMerieux) e o sistema de identificação Vitek (bioMerieux). Com o Api 20 Strep não foram obtidos resultados considerados satisfatórios, que se devem inclusive, ao fato deste kit não incluir o *S. crista* entre as possíveis espécies identificáveis. O sistema de identificação Vitek para gram positivos, apesar de também não incluir o *S. crista* entre as possíveis espécies por ele identificáveis, foi considerado satisfatório por apresentar uma série de testes capazes de confirmar e complementar os resultados obtidos na primeira fase de identificação e pelo seu baixo custo, em relação ao Api 20 Strep. O melhor sistema comercial de identificação testado para identificação do *S. crista* é sem dúvida o BBL Crystal para gram positivos (Becton Dickison), que inclusive, foi o primeiro encontrado que tem o *S. crista* entre os microrganismos que se propõe a identificar.

Os resultados bioquímicos obtidos nos testes laboratoriais convencionais foram confirmados e complementados inicialmente com o sistema de identificação Vitek (bioMerieux) e finalmente com o BBL Crystal (Becton Dickison). O intuito na utilização destes sistemas comerciais para identificação, além de confirmação dos resultados, foi principalmente de aumentar o número de parâmetros para identificação, já que eles reúnem testes bioquímicos complementares e enzimáticos inviáveis de serem preparados no laboratório.

Todas as cepas isoladas foram identificadas pelo sistema de Vitek como *S. constellatus* pelo fato deste Kit não incluir o *S. crista* entre as espécies por ele identificáveis e como *S. crista* no BBL Crystal.

Parece ser um fato coincidente que estas amostras tenham sido todas isoladas de voluntários do sexo feminino mostrando, em sua maioria, pequeno acúmulo de placa. Pode ser considerada a possibilidade de fatores hormonais serem capazes de influenciar a ocorrência desta espécie.

Após terem sido isoladas e identificadas as oito amostras de *S. crista*, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 e C8, foram executados os outros testes propostos.

Resultados obtidos por alguns autores demonstram que algumas cepas do grupo mitis, incluindo mormente o *S. crista*, são instáveis em suas características fenotípicas, sem corresponder a alterações genotípicas (Kikuchi et al., 1995; Rudney et al., 1992; Rudney & Larson, 1994) e linhagens de referência, muitas vezes, mudam suas características no laboratório, da mesma forma que podem apresentar características diversas de isolados clínicos da mesma espécie (Cvitkovitch & Hamilton, 1994).

Estudos tem sugerido que a ligação amilase pode servir como um fator de discriminação para os estreptococos do grupo mitis (Douglas et al., 1990;

Kilian & Nyvad, 1990; Scannapieco et al., 1989). A amilase é a enzima mais abundante na saliva e se liga especificamente e com alta afinidade a muitas espécies de estreptococos orais. Estreptococos que se ligam à amilase salivar, entre eles o *S. crista*, estão presentes em número significativo no biofilme dental em desenvolvimento (Brown et al., 1999).

Todas as linhagens padrão de *S. crista* usadas neste trabalho e as isoladas, foram capazes de se ligar à amilase salivar. Este teste é considerado importante, não por ser uma característica fenotípica absolutamente conclusiva no processo de identificação, mas por ser um método de fácil execução e por fornecer um resultado claro, podendo orientar na condução da identificação.

Segundo Brown et al., (1999), o grupo de estreptococos viridans constitui uma população geneticamente diversa, mas que compartilham características fenotípicas, tornando difícil sua classificação por métodos fenotípicos tradicionais. Por este fato foram utilizados neste trabalho métodos genéticos para concluir a identificação dos isolados.

Atualmente, o método que tem demonstrado resultados mais promissores no sentido de identificar os estreptococos orais é o AP-PCR e é por este motivo que resolvemos testá-lo. Trabalhando com *Streptococcus mutans*, Li & Caufield (1998) concluíram que este método é confiável, reprodutivo e informativo, antecipando que este método virá facilitar estudos de prevalência epidemiológica, características de virulência e não virulência e tipagem clonal.

De acordo com os resultados obtidos por Rudney & Larson (1999), no teste de AP-PCR com os iniciadores RR2 e 434, tanto as amostras de *Streptococcus crista* ATCC 51110 e ATCC 49999 quanto a maioria das onze cepas de *Streptococcus sanguis* por ele testadas com o iniciador RR2,

apresentaram bandas com 822 pb com variação de 7 pares de bases e com 316 pb com variação de 3 pares de bases. A amostra padrão de *Streptococcus sanguis* utilizada neste trabalho, amplificou as bandas esperadas de 316 (+3) e 822 (+7) pares de bases. As amostras padrão de *S. crista* apresentaram amplificação da banda de 822 (+7) pb e de uma banda mais pesada do que a segunda esperada, de 365 pb. Todos os isolados apresentaram as bandas de 822 (+7) pb e a segunda banda apresentada pelas amostras padrão de *S. crista*, de 365 pb. Além disso, a maioria das amostras isoladas apresentaram um padrão de amplificação muito semelhante ao das amostras padrão CR3 e CR311.

Utilizando o iniciador 434 era esperada a amplificação de uma banda de 964 pb com uma variação de 7 pb e de uma banda de 729 pb com variação de 5 pb. Tanto as amostras padrão quanto as isoladas apresentaram esta primeira banda, mas não apresentaram a segunda banda esperada. Além disso as amostras padrão CR3 e CR311 apresentaram uma banda mais leve de 489 pb, que foi observada em vários dos isolados, com exceção de C7 e C8.

Os resultados obtidos com os iniciadores RR2 e 434, não foram exatamente os esperados, segundo descrição do trabalho, pois tanto as amostras padrão quanto as isoladas não amplificaram a banda de 316 pb, utilizando-se o primeiro iniciador e a banda de 729 (+5) pb, utilizando-se o segundo iniciador. Este fato pode ser devido ao autor no qual este teste foi baseado, ter analisado em seu trabalho apenas duas amostras de *S. crista*, o que é um número baixo para conclusões definitivas como as que chegaram. Além disso, estas duas amostras usadas por eles no trabalho, *S. crista* ATCC 51110 e ATCC 49999, não corresponderem às amostras padrão aqui utilizadas. Deve também ser considerado que as amostras aqui isoladas, pelo fato de estarmos geograficamente muito distantes do local onde foram isoladas

as amostras padrão, poderem apresentar inserções ou deleções de pares de base.

Com o teste de AP-PCR visava-se confirmar a identificação das amostras isoladas suspeitas de se tratarem de *Streptococcus crista* e podemos dizer que os resultados obtidos com estes dois iniciadores, no sentido de se obter a identificação das amostras isoladas, foi considerado satisfatório, ressalvados os comentários feitos acima em relação ao iniciador 434.

De acordo com o trabalho realizado por Handley et al. (1991), é através do tufo de fibrilas lateralmente localizadas, que o *S. crista* se adere ao *C. matruchotii* no biofilme dental maduro, formando as configurações de “espigas de milho”. As amostras padrão CR311 e CR3 apresentam um tufo de fibrilas laterais que se localizam um em cada lado do septo em uma célula em divisão. Na primeira é constituído de dois comprimentos de fibrilas, sendo umas mais curtas, medindo $242 \pm 13,9$ nm, e densamente agrupadas e outras mais longas, medindo $420 \pm 39,3$ nm, que se projetam através da franja mais curta e muitas vezes se acumulam juntas. A amostra CR3 carrega apenas as fibrilas mais longas, compostas por um agrupamento de fibrilas, medindo $386 \pm 40,1$ nm. Estas fibrilas geralmente são observadas agrupadas, sendo difíceis de serem observadas individualmente por serem muito finas. Bioquimicamente as cepas AK1, CR3 e CR311 são em 78% dos casos, produtoras de glucano, apesar de CR3 não ser capaz de produzir glucano a partir da sacarose. O comprimento das fibrilas não está, aparentemente, relacionado à habilidade de se coagregar, já que as cepas com fibrilas longas e curtas aderem da mesma forma.

Aparentemente, também não há relação entre a densidade do tufo e a estrutura fina das fibrilas e sua capacidade de coagregar, já que cepas com variações nestas características apresentaram o mesmo padrão de coagregação.

A grande maioria das cepas do grupo *S. sanguis* biotipo I (grupo em que se insere o *S. crista*) isolados da placa coronária, carregam fibrilas peritricúeas, sendo apenas um pequeno número as que carregam o tufo de fibrilas. Estas linhagens com tufo são provenientes principalmente de outros sítios orais, da margem gengival, abscessos periodontais e suabe oral e de garganta. Apesar de ter sido notada a diferença entre estrutura da superfície e sítio de isolamento, são necessários outros estudos para se precisar as razões que correlacionem as diferenças na distribuição das fibrilas e o sítio de isolamento. O fato dos *S. sanguis* I e II se subdividirem em cepas com fibrilas peritricúeas, capazes de coagregar com espécies de *Actinomyces*, e cepas com tufos de fibrilas que não possuem capacidade de se coagregar com espécies de *Actinomyces*, sugere que estas cepas têm desenvolvido estruturas especializadas para coagregar com diferentes gêneros no biofilme dental. Apesar disso, cepas que não possuem fibrilas são capazes de realizar coagregação o que nos leva a concluir que, apesar das fibrilas estarem intimamente relacionadas à coagregação, existem outras adesinas envolvidas (Handley et al., 1985).

No presente estudo, no teste de coloração negativa observamos a presença do tufo localizado de fibrilas em todas as amostras isoladas. Na figura 8, anteriormente apresentada, podemos visualizar a franja de fibrilas mais curtas através da qual se projetam as fibrilas mais longas.

Buscando na literatura não foram encontrados trabalhos que tenham pesquisado a adesão de *S. crista* a linhagens celulares, mas apesar disso entendemos que estes experimentos poderiam auxiliar na compreensão dos mecanismos pelos quais se dá a adesão desta bactéria nas superfícies orais e no estabelecimento de outras infecções. Scannapieco et al. (1994), estudando fatores de adesão de *Streptococcus* orais, e entre eles o *S. crista*, conclui que

cada cepa possui um conjunto de fatores de colonização particulares. No presente trabalho foi pesquisada a adesão em células das linhagens HEp-2, KB e em células do epitélio bucal provenientes de raspado da superfície jugal. Nos testes com as células HEp-2 e KB não foram obtidos resultados positivos para adesão com nenhuma das cepas padrão assim como com as oito linhagens isoladas. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato das células HEp-2 e KB não possuírem receptores específicos para estas linhagens bacterianas. Apesar de não termos realizado o experimento nas condições para testar a capacidade de invasão, em algumas regiões da lâmina, as células se apresentaram vacuolizadas havendo a formação de um halo ao redor da bactéria, sugerindo serem capazes de invadir as células HEp-2 (dados não mostrados).

Pesquisando a adesão em raspado de células epiteliais bucais, além dos padrões, nossas amostras C1 a C8 apresentaram um padrão de adesão positiva que pode ser visualizado nas figuras 13 e 14. É possível que este resultado se deva ao fato de nossas amostras bacterianas apresentarem receptores apenas para estas células provenientes de raspado da mucosa jugal e não para as linhagens celulares HEp-2 e KB.

No biofilme dental, a capacidade de ligação da bactéria já ancorada a tecidos duros ou moles pode promover uma colonização secundária com as mesmas vantagens empregadas pelos primeiros colonizadores. Essencialmente todas as bactérias orais possuem moléculas de superfície que promovem algum tipo de interação célula-célula, algumas constitutivamente sintetizam adesinas que permitem à célula participar simultaneamente em múltiplas interações, tendo como parceiros outros tipos celulares. Em outros ecossistemas são geralmente pequenas as evidências de coagregação entre bactérias residentes. Justaposição de microcolônias bacterianas geneticamente

não relacionadas, em consórcios metabólicos levando a biodegradação anaeróbica é diferente da coagregação que é caracterizada por um reconhecimento direto célula-célula, independente da relação de viabilidade (Kolenbrander & London, 1993). A natureza física do biofilme dental provém oportunidades para interações por sinalização célula-célula, intra ou inter específica. Apesar disso os mecanismos e o papel da comunicação intercelular na formação e desenvolvimento do biofilme dental é ainda pouco compreendido. O *S. crista* é capaz de se ligar a *F. nucleatum* e *C. matruchotii* no biofilme bacteriano, formando uma estrutura peculiar, o “corn cob”. Por outro lado, o *S. crista*, através de um diálogo molecular com a *Porphyromonas gingivalis*, reprime a expressão de um gene responsável pela adesão desta última (Xie et al., 2000). Para melhor caracterização das amostras aqui isoladas, foi realizado o teste de coagregação com a *F. nucleatum* e neste teste não foi obtido o resultado esperado, já que além das amostras padrão de *S. crista*, apenas as amostras C6 e C7 foram capazes de coagregar. Não temos uma explicação para estes achados, já que as amostras padrão mostraram congregação nas mesmas condições, mas pode ser possível que por algum motivo, as amostras negativas no teste tenham perdido o tufo de fibrilas no momento da realização do mesmo. Também é possível que este teste tenha sofrido influência de alguma variável que não tenha sido detectada.

Por outro lado, podemos observar resultados bastante interessantes na reação de imunofluorescência com um marcador de fluorescência ligado ao anticorpo CC6 (figuras 15 e 16), que é reativo a linhagens com tufo de fibrilas, na qual foram obtidas reações positivas para todas as amostras isoladas. Assim como o teste de PCR, este experimento foi realizado pelo Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo em seu laboratório e pelo fato destas metodologias desenvolvidas por sua equipe ainda não terem sido publicadas na literatura, não estamos

autorizados a expor outros detalhes a respeito destes, que serão mais detalhados no momento da publicação deste trabalho.

Com o intuito de detectar nos isolados C1 a C8 um gene que somente é encontrado em amostras de *S. crista* e em uma linhagem de *S. oralis* com tufo de fibrilas, o Prof. Dr. Joseph M. DiRienzo realizou com estas amostras o teste de PCR com os iniciadores SRP003 e SRP004. Este teste foi realizado com o intuito de confirmar a identificação e caracterizar os isolados. Quatro de das oito amostras, C1, C3, C7 e C8, amplificaram o gene citado. O resultado deste teste foi considerado favorável, já que apesar de nossas amostras C2, C4, C5 e C6 não terem apresentado o gene, não significa que estas não se tratem de amostras de *S. crista*. Conforme comentário feito pelo próprio Prof. DiRienzo, apesar da presença do gene pesquisado ser considerado uma confirmação para a identificação, sua ausência pode significar apenas que estas cepas não possuem este gene e não que elas não sejam *S. crista* (comunicação pessoal). Em uma análise do comportamento dos isolados frente aos testes fenotípicos e genotípicos realizados, a não ser o PCR, não encontramos nenhuma característica que levasse a crer que estas amostras C2, C4, C5 e C6 não se tratem de *S. crista*. Este dado constitui uma ocorrência interessante pela possibilidade destas amostras, terem por alguma razão que pode inclusive ser estudada posteriormente, perdido o gene pesquisado.

Com o objetivo de caracterizar genotipicamente e obter uma análise através da correlação entre as amostras padrão e isoladas, comparando-as com outras espécies de *Streptococcus* pela construção de um dendrograma, foi realizado o teste de RAPD. Analisando o dendrograma obtido pode-se concluir que houve uma diferenciação genotípica entre os *S. crista* e as demais amostras estudadas neste teste, com uma maior proximidade das amostras PSH1a e PSH1b, sendo aquela (*S. crista*) proveniente de uma linhagem

ancestral comum a qual também deu origem às outras. Dentre os *S. crista* a amostra C3 forma um ramo ancestral primordial que deu origem a CC5AWT às demais. Desta maneira as amostras CR311 e C1 são evolutivamente mais próximas indicando uma divergência mais recente que as outras. As amostras CR3 e C4 também apresentam evolutivamente grande proximidade.

Assim podemos observar que todas as amostras estudadas descendem de um ancestral primordial comum que originou um grupo que compreende as amostras *S. suis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. gordonii*. Dentre estas amostras, a amostra que originou a linhagem *S. gordonii*, também originou as amostras de *S. parasanguis* em um grupo B1 e as linhagens de *S. crista* em um grupo B2. No caminho evolutivo acreditamos que possa ter ocorrido a perda da capacidade de síntese de fibrilas em tufo pelas linhagens anteriores aos grupos B1 e B2 ou a aquisição desta característica pelos grupos B1 e B2.

Através da análise filogenética foi possível diferenciar as linhagens de *S. crista* dos demais estreptococos testados. Correlacionando o dendrograma obtido com o resultado do teste de PCR com os iniciadores SRP003 e SRP004 verificamos que as amostras C4, C5, C2 e C6, que foram negativas neste teste, também se encontram agrupadas próximas no dendrograma de dissimilaridade confirmando a divergência genética das demais. O mesmo acontece com as amostras positivas no teste de PCR que foram agrupadas próximas no dendrograma.

O estudo do *S. crista* é considerado importante pelo fato de representar um modelo potencial para compreensão da complicada trama de interações das bactérias orais, sendo a identificação e caracterização destes microorganismos um pré-requisito para isto.

Alguns dos testes realizados neste trabalho com o *S. crista* nunca foram realizados antes, conseqüentemente não há bibliografia de apoio na qual se

basear para comentários e conclusões comparativas. Pelo fato do *S. crista* ter sido recentemente descrito e por ainda ter sido pouco pesquisado, há muito que se descobrir a seu respeito para que se possa compreender melhor seus mecanismos de adesão e seu papel nas interações que ocorrem na formação do biofilme dental e no desenvolvimento de outras patologias orais e sistêmicas.

6 –Conclusões.

- Foi possível isolar e identificar linhagens de *S. crista* e desta forma confirmar a presença desta bactéria no biofilme bacteriano supragengival de humanos da região de Campinas.
- O sistema comercial de identificação BBL Crystal associado aos testes de hemólise, catalase, bile esculina e ligação da amilase, além da coloração de Gram, foram eficazes para a identificação de *S. crista*.
- O teste de AP-PCR, a partir dos iniciadores RR2 e 434, confirmaram que as oito amostras isoladas são *S. crista*, quando comparadas com as amostras padrão.
- Através da análise do dendograma as amostras padrão e as por nós isoladas puderam ser agrupadas, confirmando que nossa caracterização está de acordo com a filogenia obtida.
- Utilizando os iniciadores SRP003 e SRP004, quatro amostras isoladas foram amplificadas, determinando a presença deste gene que confirma serem estas *S. crista*, mas não descarta a possibilidade das outras quatro também serem.
- Todas as amostras isoladas demonstraram, em microscopia eletrônica, a presença de tufo laterais de fibrilas.
- O teste de coagregação, nos parâmetros utilizados, não foi eficiente para determinar a capacidade de coagregar com a *Fusobacterium nucleatum*.
- As amostras C1 a C8, assim como as amostras padrão de *S. crista*, não foram capazes de aderir às linhagens celulares Hep-2

e KB, sendo capazes de aderir apenas às células epiteliais bucais.

7– Apêndice

• Caldo Púrpura Base

Proteose Peptone nº 3.....	10g
Extrato de Carne Bacteriológico.....	1g
Cloreto de Sódio.....	5g
Púrpura de Bromo Cresol.....	0,02g

pH 6,8
Reidratação 16g/l.

• Corante de Wright:

Eosina Azul de Metileno.....	0,3g
Glicerol.....	
Metanol p.a.....	100 ml

•Corante May-Grunwald

May Grunwald.....	2 g
-------------------	-----

Álcool
metílico.....100ml

Incubar em banho-maria a 60° C por 30 minutos. Filtrar em papel de filtro e armazenar em frasco escuro.

•Corante Giemsa

Giemsa.....	1g
Álcool metílico.....	66ml

Glicerina.....66ml

Adicionar a glicerina ao pó e aquecer à temperatura de 60°C por 30 minutos a 2 horas, então adicionar o álcool. Filtrar em papel de filtro.

• **Meio Descarboxilase Base (base de Falkon):**

Peptona Bacteriológica.....5g

Extrato de Levedura.....3g

Dextrose Bacteriológica.....1g

Púrpura de Bromo Cresol.....0,02g

L- arginina.....0,5%

Ou DL- arginina.....1%

Depois de solidificado, cobrir com óleo Nujol. Semear e incubar de 4 a 7 dias.

• **Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado (MEM)**

O meio MEM (CULTILAB) foi preparado de acordo com as especificações do fabricante.

• **Solução CTAB/NaCl**

NaCl.....4,1g

água Milli-Q.....80 ml

CTAB.....10g

Aquecer o CTAB a 65°C para dissolver. O volume deve ser ajustado para 100ml. Estocar em temperatura ambiente.

• Solução de Penicilina-Estreptomicina

Penicilina G Potássica.....	60000000U
Estreptomicina.....	60g
Hanks 1X estéril.....	6000ml

• Tampão PBS 0,1M

NaCl.....	8,0g
KCl.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O.....	2,89g
KH ₂ PO ₄	0,2g
H ₂ O milliQ.....	1000ml

Diluir todos os sais com exceção do KH₂PO₄, que deve ser diluído a parte e usado para acertar o pH. Completar o volume em balão volumétrico.

• Tampão Sorensen

Solução A M/15

KH ₂ PO ₄	9,08g
Na ₂ HPO ₄	11,87g
Água Destilada.....	1000ml

Solução B M/15

Na ₂ HPO ₄	9,47g
Água destilada.....	1000ml

Misturar 23,2 ml da solução A com 76,8 ml da solução B (ph 7,3).

• **Tampão TE 1X:**

Tris-HCL.....10mM (ph7,5)

EDTA.....1mM (ph8,0)

• **Tampão TBE:**

Tris base..... 54 g

EDTA 0,5 M..... 20 ml

Ácido Bórico.....27,5 g

Água Destilada..... 1000 ml

Ajustar o pH da solução de EDTA em 8,0 e autoclavar.

8 – Referências bibliográficas:

Amano, A.; Sharma, A.; Sojar, H. T.; Kuramitsu, H. K. & Genco, R. J. (1994) Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, 62:4682-4685.

Amano, A.; Sharma, A.; Lee, J. Y.; Sojar, H. T.; Raj, P. A. & Genco, R. J. (1996) Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. **Infect. Immun.**, 64:1631-1637.

Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J. A.; Seidman, J. G. & Struhl, K. (1988) Current protocols in molecular biology. **Greene Publishing Associates, Brooklyn, N.Y.**

Beigton, D.; Russel, R. R. B. & Hayday, H. (1981) The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype H from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). **J. Gen. Microbiol.**, 124:271-279.

Beighton, D.; Hardie, J. M. & Whiley, R. A. (1991) A scheme for the identification of *viridans* streptococci. **J. Med. Microbiol.**, 35:367-372.

Brown, A. E.; Rogers, J. D.; Haase, E. M.; Zelasko, P. M. & Scannapieco, F. A. (1999) Prevalence of the Amylase-Binding Protein A gene (*abpA*) in oral Streptococci. **J. Clin. Microbiol.**, 37:4081-4085.

Cisar, J. O.; Kolenbrander, P. E. & McIntire, F. C. (1979) Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. **Infect. Immun.**, 24:742-752.

Correia, F. F.; DiRienzo, J. M.; Lamont, R. J.; Anderman, C.; McKay, T. L. & Rosan, B. (1995) Insertional inactivation of binding determinants of *Streptococcus crista* CC5A using Tn916. **Oral Microbiol. Immunol.**, 10:220-226.

Correia, F. F.; DiRienzo, J. M.; McLay, T. L. & Rosan, B. (1996) *scbA* from *Streptococcus crista* CC5A : an atypical member of the *Ira I* gene family. **Infect. Immun.**, 64:2114-2121-a.

Correia, F. F.; McKay, T. L.; Farrow, M. F.; Rosan, B. & DiRienzo, J. M. (1996) Natural transformation of *Streptococcus crista*. **FEMS Microbiol. Letters**, 143:13-18-b.

Coykendall, A. L. & Wesbecher, P. (1987) Genetic Relationship among some *viridans* streptococci. **Xth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Cologne, F. R. G.** (in pres).

Cvitkovitch, D. G. & Hamilton, I. R. (1994) Biochemical change exhibited by oral streptococci resulting from laboratory subculturing. **Oral Microbiol. Immunol.**, 9:209-217.

Douglas, C. W. I.; Pease, A. A. & Whiley, R. A. (1990) Amylase – binding as a discriminator among oral streptococci . **FEMS Microbiol. Letters**, 66:193-198.

Ezaki, T.; Hashimoto, Y.; Takeuchi, N.; Yamamoto, H.; Liu, S.; Hiroaki, M.; Matsui, K. & Yabuuchi, E. (1988) Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. **J. Clin. Microbiol.**, 26:1708-1713.

Ferreira, M. E. & Grattapaglia. (1995) Introdução ao uso de marcadores e RADP e RFLP em análise genética. **EMBRAPA, CENARGEM, Brasília, DF.**

Fitzsimmons, S.; Evans, M.; Pearce, C.; Sheridan, M. J.; Wientzen, R.; Bowden, G. & Cole, M. F. (1996) Clonal diversity of *Streptococcus mitis* biovar 1 isolates from the oral cavity of human neonates. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 3:517-522.

Frandsen, E. V. G.; Pedrazzoli, V. & Kilian, M. (1991) Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. **Oral. Microbiol. Immunol.**, 6:129-133.

Gibbons, R. J.; Hay, D. I. & Schlesinger, D. H. (1991) Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. **Infect. Immun.**, 59:2948-2954.

Handley, P. S.; Carter, P. L.; Wyatt, J. E. & Hesketh, L. M. (1985) Surface structure (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. **Infect. Immun.**, 47:217-227.

Handley, P.; Coykendall, A.; Beighton, D.; Hardie, J. M. & Whiley, R. A. (1991) *Streptococcus crista* sp. nov., a viridans *Streptococcus* with tufted fibrils, isolated from the human oral cavity and throat. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, 41:543-547.

Jenkinson, H. F. (1994) Cell surface protein receptors in oral streptococci. **FEMS Microbiol. Letters**, 121:133-140.

Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.; Miura, H. & Ezaki, T. (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 45:406-408.

Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Todome, Y.; Sultana, F.; Hirose, K.; Shu, S. E.; Ezaki, T. & Ohkuni, H. (1998) *Streptococcus peroris* sp. nov. and *Streptococcus infantis* sp. nov., new members of the *Streptococcus mitis* group, isolated from human clinical specimens. **Inter. J. Syst. Bacteriol.**, 48: 921-927.

Kikuchi, K.; Enari, T.; Totsuka, K. & Shimizu, K. (1995) Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. **J. Clin. Microbiol.**, 33:1215-1222.

Kilian M.; Mikkelsen L. & Henrichsen J. (1989) Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982) and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 39:471-484.

Kilian, M. & Nyvad, B. (1990) Ability to bind salivary α -amilase discriminates certain viridans streptococcal species. **J. Clin. Microbiol.** 28:2576-2577.

Kolenbrander, P. E. & London, J. (1993) Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, 175:3247-3252.

Koneman, E. W.; Allen, S. A.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. & Winn Jr, W. C. (1997) In: “**Color Atlas and Textbook of Microbiological Diagnostic**”

Lamont, R. J. & Jenkinson, H. F. (1998) Life below the gun line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62:1244-1263.

Lancy Jr., P.; Appelbaum, B.; Holt, S. C. & Rosan, B. (1980) Quantitative in vitro assay for “corncob” formation. **Infect. Immun.**, 29:663-670.

Lancy Jr., P.; Dirienzo, J. M.; Appelbaum, B.; Rosan, B. & Holt, S. C. (1983) Corncob formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus sanguis*. **Infect. Immun.**, 40:303-309.

Li, Y. & Caufield, P. W. (1998) Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. **Oral Microbiol. Immunol.**, 13:17-22.

Listgarten, M. A. (1999) Formation of dental plaque and other oral biofilms, In **H. N. Newman and M. Wilson (ed.), Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Bioline, Cardiff, Wales, 187-210.**

Magee, J. T.; Hindmarch, J. M. & Douglas, C. W. I. (1997) A numerical taxonomic study of *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* and similar programmes using conventional tests and pyrolysis mass spectrometry. **Zbl. Bakt.**, 285: 195-203.

Menard, C. & Mouton, C. (1993) Randomly amplified polymorphic DNA analysis confirms the biotyping scheme of *Porphyromonas gingivalis*. **Res. Microbiol.**, 144:445-455.

Mouton, C.; Reynolds, H. S. & Genco, R. J. (1980) Characterization of tufted streptococci isolated from the “corncob” configuration of human dental plaque. **Infect. Immun.**, 27:235-245.

Nyvad, B. & Kilian, M. (1990) Comparison of initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. **Caries Res.**, 24:267-272.

Pacheco, A. B. F.; Guth, B. E. C.; Almeida, D. F. & Ferreira, L. C. S. (1996) Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by random amplification of polymorphic DNA. **Res. Microbiol.**, 147:175-182.

Pearce, C.; Bowden, G. H.; Evans, M.; Fitzsimmons, S. P.; Johnson, J.; Sheridan, M. J.; Wientzen, R. & Cole, M. F. (1995) Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. **J. Med. Microbiol.**, 42:67-72.

Rudney, J. D.; Neuvar, E. K. & Soberay, A. H. (1992) Restriction endonuclease fragment polymorphisms of oral viridans streptococci compared by conventional and field-inversion gel electrophoresis. **J. Dent. Res.**, 71:1182-1188.

Rudney, J. D. & Larson, C. J. (1993) Species identification of oral *viridans* streptococci by restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes. **J. Clin. Microbiol.**, 31:2467-2473.

Rudney, J. D. & Larson, C. J. (1994) Use of restriction fragment polymorphism analysis of rRNA genes to assign species to unknown clinical isolates of oral *viridans* streptococci. **J. Clin. Microbiol.**, 32:437-443.

Rudney J. D. & Larson C. J. (1999) Identification of oral mitis group streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol.**, 14:33-42.

Sambrook, J.; Fritsh, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Scaletsky, I. C. A.; Milani, S. R.; Trabulsi, L. R. & Travassos, L. R. (1988) Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 2979-2983

Scannapieco, F. A.; Bergey, E. J.; Reddy, M. S. & Levine, M. J. (1989) Characterization of salivary α -amylase binding to *Streptococcus sanguis*. **Infect. Immun.**, 57:2853-2863.

Scannapieco, F. A.; Haraszthy, G. G.; Cho, M. I. & Levine, M. J. (1992) Characterization of a α -amylase-binding component from *Streptococcus gordonii* G9B. **Infect Immun.**, 60:4726-4733.

Scannapieco, F. A.; Solomon, L. & Wandenya, R. O. (1994) Emergence in human dental plaque and host distribution of α -amylase-binding Streptococci. **J. Dent. Res.**, 73:1627-1635.

Scannapieco, F. A.; Torres, G. I. & Levine, M. J. (1995) Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. **J. Dent. Res.**, 74:1360-1366.

Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1992) The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J. Periodontol.**, 63:322-331.

St. Geme III, J. W. & Cutter, D. (1996) Influence of pili and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. **Mol. Microbiol.**, 21:21-31.

Stinson, M. W.; McLaughlin, R.; Choi, S. H.; Juarez, Z. E. & Barnard, J. (1998) Streptococcal histone-like protein: primary structure of hlpA and protein binding to lipoteichoic acid and epithelial cells. **Infect. and Immun.**, 66:259-265.

Sutton, N. A.; Hughes, N. & Handley, P. S. (1994) A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and the electroscan wet scanning electron microscope to study the structure of a biofilm of *Streptococcus crista* CR3. **J. Appl. Bacteriol.**, 76:448-454.

Tokuda, M.; Duncan, M.; Choo, M. I. & Kuramitsu, H. K. (1996) Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces. **Infect. Immun.**, 64:4067-4073.

Van Der Mei, H. C.; Naumann, D. & Busscher, H. J. (1993) Grouping of oral streptococcal species using Fourier-Transform infrared spectroscopy in

comparison with classical microbiological identification. **Arch. Oral Biol.**, 38:1013-1019.

van Houte, J. (1976) Oral bacterial colonization: mechanisms and implications. **Spec. Suppl. Microbiol. Abstr.**, 1:3-32.

Welsh, J.; Fretzman, C.; Postic, D.; Giron, I.S.; Baraton, G. & McClelland, M (1992) Genomic fingerprinter by arbitrarily primers in the Polymerase Chain Reaction resolves *Borrelia burgdoferi* into distinct phylogenetic groups. **Int. J. Sys. Bact.**, 42:370-377.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, 18:7213-7218.

Williams, J. G.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalsk, J. A. & Tingly, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, 18:653-655.

Whiley R. A.; Fraser H. Y.; Douglas C. W. I.; Hardie J. M.; Williams A. M. & Collins M. D. (1990) *Streptococcus parasanguis* sp. nov. an atypical viridans *Streptococcus* from human clinical specimens. **FEMS Microbiol Lett.**, 68:115-122.

Whittaker, C. J.; Klier, C. M. & Kolenbrander, P. E. (1996) Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, 50:513-552.

Willcox, M. D. P.; Patrikakis, M.; Harty, D. W. S.; Loo, C. Y. & Knox, K. W. (1993) Coaggregation of oral lactobacilli with streptococci from the oral cavity. **Oral Microbiol. Immunol.**, 8:319-321.

Willcox, M. D. P. (1996) Identification and classification of species within the *Streptococcus sanguis* group. **Austral. Dental J.**, 41:107-112.

Wyatt, E. J.; Hesketh, L. M. & Handley, P. S. (1987) Lack of correlation between febrils, hydrophobicity and adhesion for strains of *Streptococcus sanguis* biotypes I and II. **Microbios.**, 50:7-15.

Yao, E. S.; Lamont, R. J.; Leu, S. P. & Weinberg, A. (1996) Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. **Oral Microbiol. Immunol.**, 11:35-41.

Xie, H.; Cai, S & Lamont, R. J. (1997) Environmental regulation of fimbrial gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.** 65:2265-2271.

Xie, H.; Cook, G. S.; Costerton, J. W.; Bruce, G.; Rose, T. M. & Lamont, R. J. (2000) Intergeneric Communication in Dental Plaque Biofilms. **Journal of Bacteriol.**, 24:7067-7069.