



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **RAFAEL NOBREGA STIPP**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 020

RAFAEL NOBREGA STIPP

**PRESENÇA QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE
ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS EM CRIANÇAS COM
LESÃO DE CÁRIE ATIVA OU PARALISADA.**

Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como requisito para
obtenção de título de graduação em
Odontologia.

**PIRACICABA
2003**

RAFAEL NOBREGA STIPP

**PRESENÇA QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE
ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS EM CRIANÇAS COM
LESÃO DE CÁRIE ATIVA OU PARALISADA.**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção de título de graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

**PIRACICABA
2003**

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão durante todo o período de graduação.

Dedico também à toda minha família, que diretamente ou indiretamente ajudou nas conquistas obtidas por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, pela orientação, contribuição e compreensão durante a minha formação.

Ao responsável pela área de Microbiologia e Imunologia Prof. Dr. José Francisco Höfling, pela transmissão com integridade dos seus conhecimentos e ensinamentos, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas Marcelo Henrique Napimoga e Flávia Martão Flório, pelo carinho, amizade e dedicação aos ensinamentos transmitidos.

Aos técnicos de laboratório Anderson Laerte Teixeira e Wilma Ferraz, pela presença, ajuda e prontidão no decorrer das atividades diárias.

Aos demais colegas da Disciplina de Microbiologia e Imunologia pela amizade e companheirismo.

À todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, contribuindo para a realização deste trabalho, meu agradecimento.

*"Os homens não se tornam mais civilizados
por seu desejo de acreditar, mas por sua boa
disposição em duvidar."*

Henry Louis Mencken

SUMÁRIO

1. LISTAS:	7
1.1 Lista de tabelas, ilustrações e gráficos:	7
1.2 Lista de abreviaturas e siglas:	8
2. RESUMO:	9
3. INTRODUÇÃO:	10
3.1 Revisão da literatura:	10
3.2 Justificativa:	13
3.3 Resultados e benefícios esperados:	14
4. DESENVOLVIMENTO:	14
4.1 Fase piloto:	14
4.2 Seleção da amostra:	15
4.3 Procedimentos realizados nos voluntários:	15
4.4 Procedimentos microbiológicos:	16
4.4.1 Colheita das amostras:	16
4.4.2 Processamento do material:	16
4.4.3 Padrão bioquímico:	17
4.4.4 Fermentação de carboidratos:	18
4.4.5 Produção de peróxido de hidrogênio:	19
4.4.6 Resistência a bacitracina:	20
4.4.7 Hidrólise da arginina:	20
4.4.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR):	21
4.4.9 Produção de ácidos:	22
6. CONCLUSÃO:	23
6.1 Frequência de isolamento:	23
6.2 Contagem de estreptococos grupo mutans:	25
6.3 Relação estreptococos grupo mutans x estreptococos totais:	26
6.4 Decréscimo de pH:	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	29

1. LISTAS:

1.1 LISTA DE TABELAS, ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS:

	Pág.
Tabela 01 - Grupos estudados	15
Tabela 02 - Nichos de coleta nos grupos estudados	16
Figura 01 - Swab utilizado para a colheita	16
Figura 02 - Procedimentos para conservação das cepas	17
Tabela 03 - Divisão dos EGM pelas características bioquímicas	18
Figura 03 - Teste bioquímico de fermentação de carboidratos	19
Figura 04 - Repicador de <i>Steer</i>	19
Figura 05 - Teste bioquímico de produção de H ₂ O ₂	20
Figura 06 - Teste bioquímico de hidrólise de arginina	21
Figura 07 - Identificação por PCR	22
Figura 08 - Termociclador	22
Figura 09 - Protocolo do teste de produção de ácidos <i>in vitro</i>	22
Figura 10 - Fita para medição do pH (Merck®)	23
Tabela 04 - Número de espécies isoladas conforme os grupos e voluntários.....	23 24
Gráfico 01 - Frequência de isolamento em porcentagem	24
Gráfico 02 - Média das unidades formadoras de colônia (UFC) de EGM por paciente e média do grupo	25
Gráfico 03 - Relação entre EGM/ <i>Streptococcus sp</i> presente na saliva dos voluntários	27
Gráfico 04 - Decréscimo de pH em função do tempo	28

1.2 LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

μL	-	Microlitro
EGM	-	Estreptococos Grupo Mutans
mL	-	Mililitro
MSA	-	Mitis Salivarius Agar
MSB	-	Mitis Salivarius Agar + Bacitracina
<i>S. mutans</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	-	<i>Streptococcus sobrinus</i>

2. RESUMO:

Os estreptococos grupo mutans (EGM) destacam-se como agentes causais primários da cárie dental no homem e, embora multifatorial, a placa bacteriana é o fator etiológico determinante da doença cárie (BUISCHI & AXELSSON, 1997) sendo de fundamental importância para sua iniciação e desenvolvimento. Neste estudo objetivou-se quantificar e identificar as espécies pertencentes ao grupo mutans presentes na cavidade oral de crianças de 6 a 7 anos de idade, com lesões iniciais de cárie ativas (Grupo 1) ou paralisadas (Grupo 2), através da verificação microbiológica pelas técnicas de cultura e PCR em três nichos distintos (saliva, superfície oclusal com lesão e superfície lisa hígida), bem como analisar seu potencial cariogênico. Os resultados mostraram que os níveis de EGM foram maiores, em todos os nichos de colheita, nos voluntários do Grupo 1, sendo que 93,5% das amostras foram identificadas como sendo *S. mutans* (SM) e 6,5% classificadas como *S. sobrinus* (SS), enquanto que no Grupo 2 96,7% das amostras foram identificadas como sendo SM e 3,3% SS não havendo diferenças entre os grupos. Na análise do potencial cariogênico, observou-se diferentes perfis de queda de pH dos isolados, sendo que as cepas de SM do G1 mostraram uma maior capacidade de redução do pH do meio, nos períodos de 6 e 12 horas, estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em comparação com as cepas do G2. Os resultados deste estudo sugerem que existam diferenças nos fatores de virulência apresentados por microrganismos isolados de lesões ativas ou paralisadas.

3. INTRODUÇÃO:

3.1 REVISÃO DA LITERATURA:

A microbiota complexa que coloniza a cavidade oral dos seres humanos é um reflexo da grande diversidade de ecossistemas disponíveis a seu desenvolvimento. Pertencentes a essa microbiota, os estreptococos grupo mutans (EGM) destacam-se como agentes causais primários da cárie dental no homem (SHKLAIR & KEENE, 1974; LOESCHE, 1993; HIROSE *et al.*, 1993; THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995; WHILEY & BEIGHTON, 1998).

O papel central dos EGM no desenvolvimento da cárie dental humana já está bem estabelecido (LOESCHE, 1993). Além de apresentarem grande habilidade adesiva e ácido-secretora (HIROSE *et al.*, 1993) reúnem outros fatores de virulência para o desenvolvimento da cárie dental, como aciduricidade e capacidade de síntese de polissacarídeos intracelulares e de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis em água (LOESCHE, 1993; THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

Atualmente, estes estreptococos compreendem 7 espécies bacterianas diferentes: *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus* e *Streptococcus sobrinus* (WHILEY & BEIGHTON, 1998). As espécies: *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus* são identificáveis no homem. *S. mutans* e *S. sobrinus* (isolados exclusivamente de humanos) são as espécies mais importantes na patogênese da cárie dental (WHILEY & BEIGHTON, 1998).

Relacionando a presença quantitativa desses microrganismos, SHKLAIR & KEENE (1974) demonstraram uma baixa frequência de isolamentos de *S. mutans* e baixa porcentagem dessa espécie em relação aos estreptococos totais isolados

de placa dental em indivíduos livres de cárie (CPOD = 0), quando comparados com outro grupo composto por indivíduos cárie-ativos (CPOD médio = 10,5).

HIROSE *et al.* (1993), compararam a presença de *S. mutans* na saliva aos índices de cáries em crianças. Os resultados mostraram que os escolares que possuíam as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentavam índices de cáries significativamente mais elevados que as crianças colonizadas por apenas uma das espécies, e que o *S. sobrinus* estava mais intimamente associado às lesões de superfície lisa, sugerindo uma maior capacidade de adesão desse microrganismo à estrutura dentária, quando comparada à espécie *S. mutans*. Outros estudos (CARLSSON, 1968; BEIGHTON *et al.*, 1987; KÖHLER & BJARNASON, 1987; LINDQUIST & EMILSON, 1991) também demonstraram uma relação positiva entre a presença de uma dessas duas espécies, e a cárie dental. O *S. mutans* é a espécie mais encontrada na cavidade bucal, seguida pelo *S. sobrinus*, sendo que quando estas duas espécies estão associadas, podem elevar o índice desse processo infeccioso em seus portadores (LINDQUIST & EMILSON, 1991).

Estudos epidemiológicos da distribuição de EGM e sua relação com a saúde dentária, envolvendo populações humanas de várias faixas etárias, diferente modos de vida, diversas localizações e distintas classes sócio-econômicas têm sido feitos, empregando-se amostras de placa dentária (MUNDORFF *et al.*, 1990) e saliva (BRETZ *et al.*, 1992); entretanto pouco se sabe sobre a distribuição das espécies do grupo mutans nos diversos nichos ecológicos da cavidade oral.

Dentre os fatores de virulência apresentados por essas bactérias, destaca-se a habilidade ácido-secretora, que presente, parece ser de intensidade variável

entre as espécies do grupo mutans. Segundo PEREIRA (1998), as amostras de EGM isoladas e em associação, se comportam de modo diversificado, ao longo do período de incubação, apresentando momentos distintos de maior queda do pH do meio de cultura. KÖHLER *et al.* (1995) observaram grandes diferenças na produção de ácido em meio com pH controlado de 5,5 entre cepas de *S. mutans* isoladas de humanos, sendo que algumas das cepas mais acidogênicas de *S. mutans* produziram uma quantidade de ácido cerca de cinco vezes maior do que outras da mesma espécie. Embora tenham detectado grandes variações na acidogenicidade entre cepas *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos, esses autores não foram capazes de correlacionar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por estes microrganismos.

DE SOET *et al.* (1991) analisando as diferenças no potencial cariogênico entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, verificaram que o número de lesões cariosas em ratos colonizados por *S. mutans* foi significativamente menor que os colonizados por *S. sobrinus*, e, o *S. sobrinus* também produziu ácidos mais rápido, ocasionando uma queda mais brusca do pH, quando comparado ao *S. mutans*. Os autores sugerem que esses resultados se devem a diferenças nas propriedades glicolíticas entre as duas espécies.

Alguns estudos (KÖHLER & KRASSE, 1990; BOWDEN, 1997), demonstraram diferenças no potencial cariogênico entre cepas de estreptococos grupo mutans isoladas de humanos, portanto, variações nos fatores de virulência destes microrganismos podem influenciar o desenvolvimento da cárie dental.

Em estudo recente, GRANER (1999) conclui que não houve relação positiva estatisticamente significativa entre os valores de pH final atingidos por cepas de *S. mutans* e a incidência de cárie dental em crianças infectadas, entretanto poucos isolados de cada paciente foram testados, havendo porém, variações entre cepas.

Pelo exposto, a diversidade existente nessas espécies bacterianas é evidente, considerando-se que ainda variações fenotípicas e genotípicas foram observadas através de estudos de sorotipagem, tipagem de bacteriocinas, biotipagem e análise de DNA (BOWDEN, 1997). A presença de diferentes clones neste grupo de microrganismos pode implicar na seleção de cepas mais virulentas. (MUSSER *et al*, 1988; MAYER *et al*, 1999; GRANER, 1999).

Este é um campo promissor para o melhor entendimento do processo de indução da cárie dental por estes microrganismos, uma vez que, variações na cariogenicidade das cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus* isoladas de humanos foram observadas em modelos animais (KÖHLER & KRASSE, 1990; DE SOET *et al.*, 1991) e em estudos "*in vitro*" (PEREIRA, 1998; GRANER, 1999).

3.2 JUSTIFICATIVA:

Com relação às superfícies oclusais, em especial às dos primeiros molares permanentes, amostra deste estudo, a época crítica para o desenvolvimento de cárie dentária refere-se ao período de erupção, média de 6 a 9 meses segundo MÅNSSON (1977) e de 9 a 12 meses segundo CARVALHO & MALTZ (1997), momento em que o dente encontra-se em infra-oclusão quando a estagnação do biofilme é facilitada pela presença do capuz gengival, dificuldade de higienização e impossibilidade da autolimpeza resultante da utilização funcional do dente.

Na literatura, observa-se que a superfície oclusal é responsável pelos maiores índices de incidência de cárie em crianças (BURT, 1986; MITCHELL & MURRAY, 1989; PINTO, 1995; PEREIRA & MOREIRA, 1995), sendo responsável por 65 a 70% do componente cariado do índice CPOD, em crianças de 7-12 anos de idade, da cidade de Piracicaba – S. Paulo (PEREIRA & MOREIRA, 1995; MENEGHIN, 1999).

Considerando-se que a cárie dentária é uma doença endêmica em sociedades industrializadas (VAN HOUTE, 1994), infecciosa (LOESCHE, 1993; THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995) e transmissível (CAUFIELD, 1997), e reconhecendo-se que embora multifatorial, a placa bacteriana é o fator etiológico determinante da doença (BUISCHI & AXELSSON, 1997) tornam-se necessários estudos de perfis comparativos da colonização e potencial cariogênico desses microrganismos para indicar se existe ou não uma correlação entre o perfil de colonização e intensidade de fatores de virulência com a história de cárie do voluntário.

3.3 RESULTADOS E BENEFÍCIOS ESPERADOS:

O conhecimento das informações pode revelar se existe ou não diferenças inerentes a composição e potencial cariogênico da microbiota em lesões de cárie ativas ou paralisadas.

4. DESENVOLVIMENTO:

4.1 FASE PILOTO:

Nesta fase foi realizada a calibração do pesquisador responsável pelos exames utilizados para a seleção da amostra e seu treinamento para a colheita

das amostras clínicas.

4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA:

Como critério de uniformização da amostra, todas as crianças selecionadas para o estudo residiam em Piracicaba-SP pelo menos desde os 2 anos de idade, beneficiadas portanto pela fluoretação das águas de abastecimento público (0,7 ppm F).

Após a aprovação do estudo pelo CEP da FOP-UNICAMP, dezesseis crianças na faixa etária de 7 a 8 anos que apresentaram pelo menos dois primeiros molares permanentes em oclusão completa foram selecionadas e divididas em dois grupos de acordo com a presença ativa da lesão ou presença da lesão paralisada de cárie de esmalte na superfície oclusal destes dentes.

Para confirmação da extensão da lesão (WEERHEIJM, 1992) ou para a identificação de lesões ocultas (GRAY & PATERSON, 1997), foi realizado o exame radiográfico interproximal, excluindo-se assim lesões cariosas que ultrapassavam a junção amelo-dentiária.

4.3 PROCEDIMENTOS REALIZADOS NOS VOLUNTÁRIOS:

Os voluntários foram divididos (Tabela 01) em dois grupos de estudo de acordo com a característica da superfície oclusal dos 1^{os} molares permanentes.

Tabela 01 - Grupos estudados.

Grupo 1:	08 crianças com evidência clínica de lesão incipiente ativa no 1 ^o molar permanente.
Grupo 2:	08 crianças com evidência clínica de lesão incipiente paralisada no 1 ^o molar permanente.

4.4 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS:

4.4.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS:

Em uma única consulta, as colheitas foram realizadas através da utilização de *swabs* autoclavados pré-pesados. Obtivemos amostras de três nichos distintos de cada voluntário de acordo com o grupo (Tabela 02).

Tabela 02 - Nichos de coleta nos grupos estudados.

Grupo 1: saliva; superfície oclusal cariada, superfície lisa hígida.

Grupo 2: saliva; superfície oclusal com cárie paralisada, superfície lisa hígida.

A colheita de saliva foi realizada conforme metodologia utilizada por DASANAYAKE *et al.* (1993), enquanto que a colheita de material depositado sobre as superfícies dentárias foi realizada através da raspagem do *swab* sobre a superfície requerida (Figura 01).



Figura 01 - *Swab* utilizado para a colheita.

4.4.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL:

As amostras obtidas foram transportadas imediatamente ao laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP, em banho de gelo, submetidas a

30 segundos de vibração em um agitador de tubos (Phoenix – AT 56), sendo então diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-5} solução salina 0,9%.

Para o cultivo dos EGM, alíquotas de 5µL de cada diluição foram inoculadas em duplicata em placas de Petri, contendo meio Mitis Salivarius Bacitracina (MSB). Após incubação a 37°C por 24-48 horas em atmosfera com pCO₂ de 10% (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments – USA), foram coletadas entre 15 e 20 colônias (de cada nicho pesquisado, totalizando por volta de 50 cepas/voluntário) com características morfológicas típicas e transferidas individualmente para um tubo de cultura contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), sendo incubadas em condições ótimas para seu desenvolvimento celular (37°C, pCO₂ 10%, 24-48 horas). Após o crescimento bacteriano, alíquota-se 1000µL do subcultivo para identificação e outros 500µL são armazenados em tubos contendo 500µL de BHI-Glicerol 20% (em duplicata) (Figura 02).

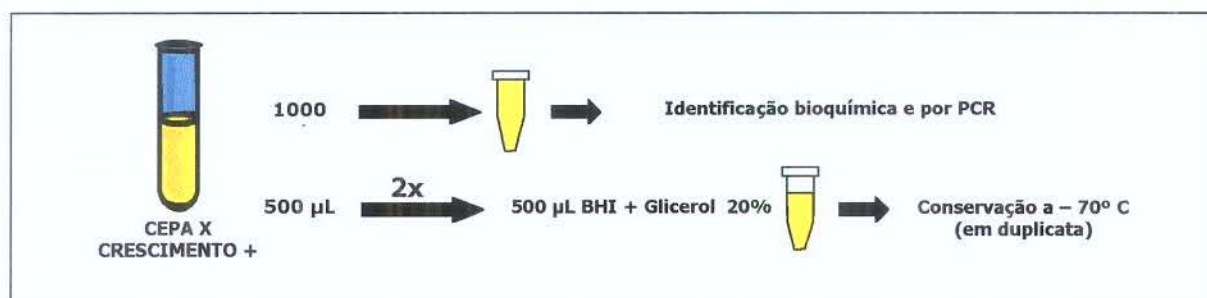


Figura 02 - Procedimentos para conservação das cepas selecionadas.

4.4.3 PADRÃO BIOQUÍMICO:

A identificação das cepas de EGM foi realizada através de provas bioquímicas, seguindo-se a tabela das características bioquímicas (Tabela 03), segundo os critérios adotados no Manual de Bergey (HARDIE, 1986). As

inoculações foram realizadas sempre a partir de culturas recentes (24 horas) em BHI.

Tabela 03 - Divisão espécies de EGM segundo suas características bioquímicas.

Espécies	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. rattus</i>	<i>S. cricetus</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. ferus</i>	<i>S. macacae</i>	<i>S. downei</i>
Sorotipos	c-e-f	e	b	a	d-g	c	c	h
Fermentação:								
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	-	+	+	-**	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-**	-	+	-
Produção de H ₂ O ₂	-	-	-	-	+	-	-	-
Hidrólise da Arginina	-	-	+	-	-	-	-	-
Resistência à Bacitracina	+	+	+	-	+	-	-	-

(*) algumas cepas podem dar resultado negativo; (**) algumas cepas podem dar resultado positivo.

4.4.4 FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS:

Para esta prova bioquímica é utilizado o meio base constituído por caldo de tioglicolato sem dextrose e sem açúcar; 1,5% de bacto ágar e 0,0016% de púrpura de bromocresol. Após dissolução dos componentes em água destilada, o pH é acertado para 7,0 e o meio base esterilizado. Os substratos manitol, sorbitol, melibiose e rafinose são esterilizados utilizando-se membranas filtrantes com poros de 0,22 µm (Millipore®), e adicionados ao meio na proporção final de 1,0% (Figura 03).

Utilizando-se o repicador de Steer (Figura 04), são inoculados 5 µL de uma suspensão bacteriana ajustada para $1-2 \times 10^8$ UFC/mL nas placas contendo os

diferentes carboidratos, e estas devem ser incubadas nas condições ideais para cultivo de EGM. A leitura foi realizada entre 18 e 22 horas após a inoculação. A prova é considerada positiva quando houver viragem do indicador de pH, da cor púrpura para a amarela (Figura 03).

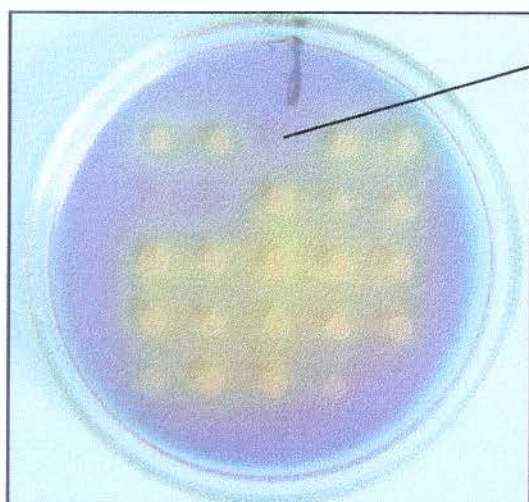


Figura 03 - Teste bioquímico de fermentação de carboidratos.

Controle Negativo

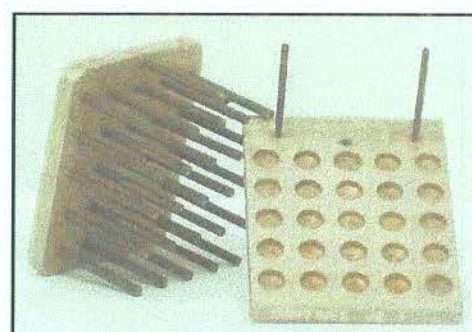


Figura 04 - Repicador de *Steer*.

4.4.5 PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO:

A prova de produção de peróxido de hidrogênio é realizada segundo WHITTENBURY (1964). A semeadura a partir das culturas das cepas em BHI, consiste de 3 inoculações próximas, tipo "picada", feitas com agulha de platina diretamente no meio de cultura. As placas são então incubadas em pCO₂ 10%, por um período de até 7 dias a 37°C. A produção de peróxido de hidrogênio é detectada pela presença de halo marrom-escuro ou preto em torno do crescimento bacteriano (Figura 05).

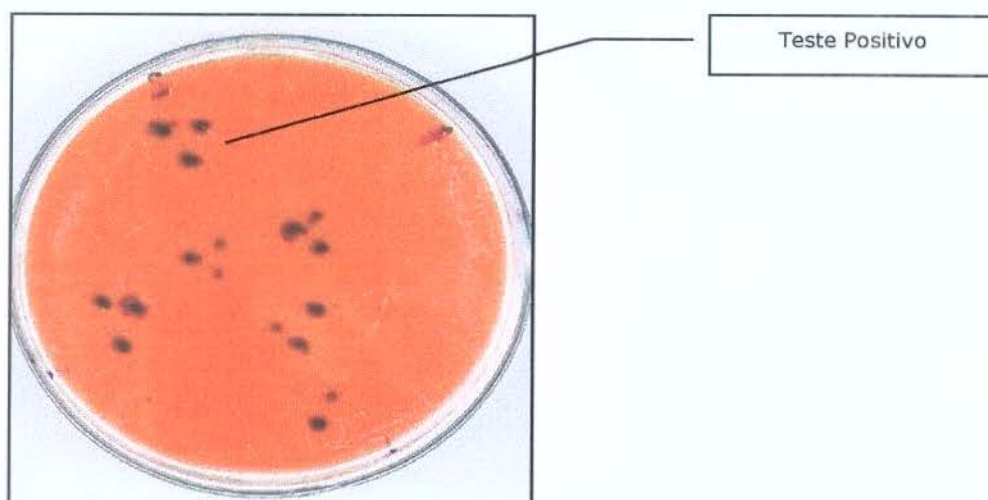


Figura 05 - Teste bioquímico de produção de H_2O_2 .

4.4.6 RESISTÊNCIA A BACITRACINA:

Ao meio base utilizado no teste de fermentação de manitol (SHKLAIR & KEENE, 1974), deve ser acrescido duas unidades internacionais de bacitracina por mililitro. O crescimento do microrganismo indica sua resistência ao antibiótico presente no meio, observada com a mudança da cor púrpura para amarela, o que indica a fermentação do manitol.

4.4.7 HIDRÓLISE DA ARGININA:

Esta prova se baseia na produção ou não da enzima arginina-desaminase, a qual libera amônia ao agir sobre o substrato arginina. A capacidade das cepas hidrolisarem arginina produzindo amônia, é testada como preconizado por NIVEN *et al.* (1942) e preparado segundo AZEVEDO (1988). As cepas são semeadas transferindo-se 0,1 mL do inóculo para os tubos contendo o meio de cultura, e estes incubados a 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, duas gotas do reativo de Nessler são adicionadas a cada tubo. A presença de amônia

na cultura, evidenciada pelo aparecimento de coloração alaranjada, indica reação positiva enquanto que a coloração amarela indica o controle negativo (Figura 06).

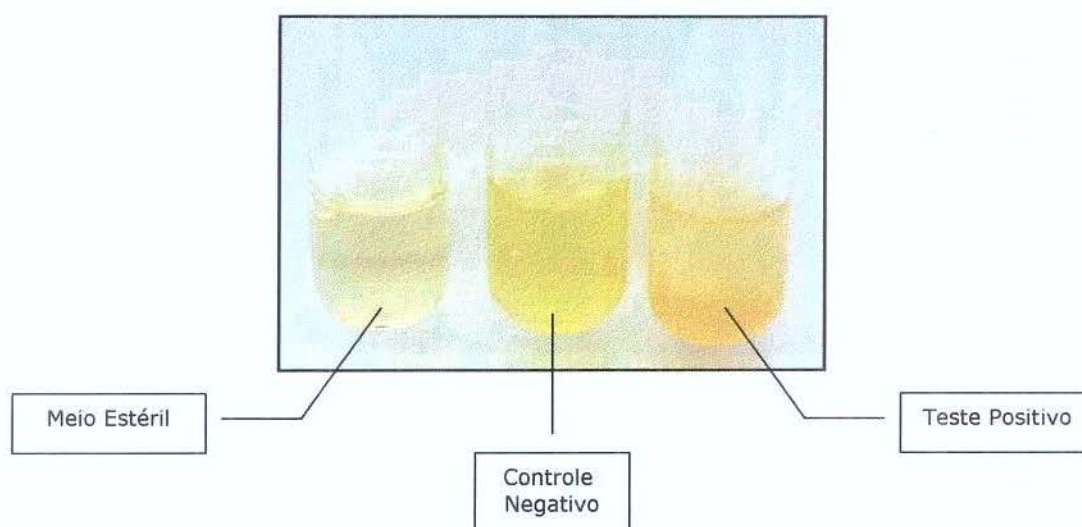
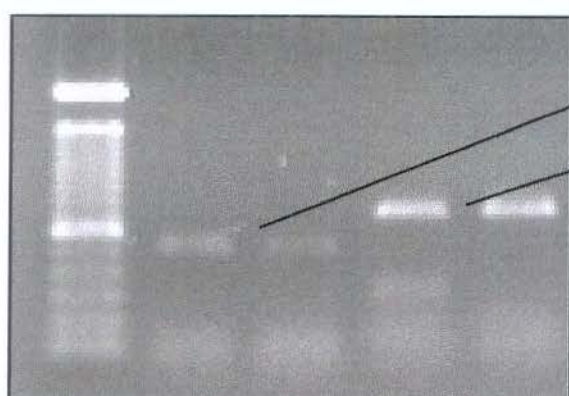


Figura 06 - Teste bioquímico de hidrólise de arginina.

4.4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR):

Os subcultivos são inoculados em frascos com 5 mL de BHI, incubados a 37°C, pCO₂ 10%, por 24-48 horas. Para obtenção do DNA bacteriano, centrifuga-se os meios de cultura e os sedimentos obtidos são transferidos para tubos de *ependorf*, onde são lavados com 1 mL de solução salina 0,9%. Após a centrifugação, as células são re-suspendidas em 100 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% de Triton X-100, pH 8,0) e fervidas por 10 minutos (OHO *et al.*, 2000). O DNA de cada bactéria é então submetido a amplificação para a confirmação molecular da identidade do *S. mutans* e *S. sobrinus* (Figura 07) na presença de um par de "primers" espécie-específicos - primers desenhados por OHO *et al.* (2000). É utilizado como controle positivo *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. sobrinus* (ATCC 27607).



S. mutans 517 pb

S. sobrinus 712 pb



Figura 07 - Identificação por PCR.

Figura 08 - Termociclador

4.4.9 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS:

Para a determinação da capacidade de produção de ácidos pelos diferentes isolados de EGM são utilizadas medições em intervalos de tempo crescentes (0, 3, 6, 12, 24 hrs) do pH do meio de cultura onde as cepas estão cultivadas. As amostras devem ser previamente inoculadas em meio BHI para obtenção de culturas recentes. A suspensão bacteriana é ajustada para $1-2 \times 10^8$ UFC/mL e alíquotas de 100 μ L de cada amostra são inoculadas em meio BHI a 5% de sacarose (Figura 09). O pH pode ser medido através de fitas indicadoras, com alcance de 4 à 7, subdivisões de 0,4 (MERCK). Os testes devem ser em triplicata.

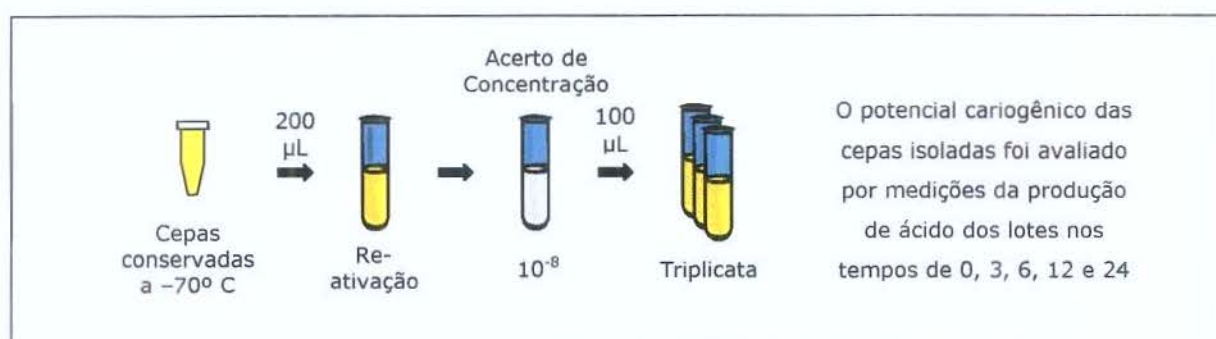


Figura 09 - Protocolo da realização do teste de produção de ácidos *in vitro*.

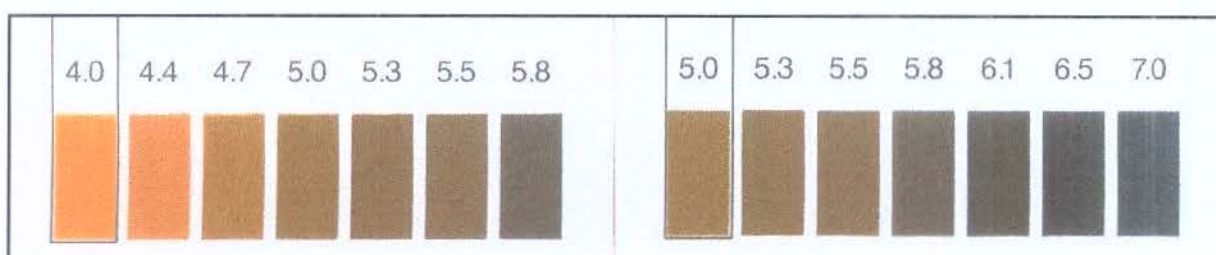


Figura 10 - Fita para medição do pH (Merck®)

6. CONCLUSÃO:

6.1 FREQUÊNCIA DE ISOLAMENTO:

Com relação à atividade cariogênica, há sugestões na literatura que indivíduos portadores de *S. mutans* associado a *S. sobrinus* possuiriam maior índice de cárie dentária em relação aos que possuísem somente o *S. mutans* (DAVEY & ROGERS, 1984; HIROSE *et al.*, 1993; KÖHLER & BJARNASON, 1987; TORRES *et al.*, 1991).

Neste estudo isolamos 752 amostras, as quais foram identificadas como sendo *S. mutans* ou *S. sobrinus*. Em porcentagem, 93,3% das amostras do Grupo Cárie Ativa (G1) foram identificadas como sendo *S. mutans* e 6,7% classificadas como *S. sobrinus*; no Grupo Cárie Paralisada (G2) 96,4% das amostras foram identificadas como sendo *S. mutans* e 3,6% como *S. sobrinus* (Gráfico 01), não havendo diferenças estatísticas entre os grupos (Mann Whitney, $p > 0,05$).

Tabela 04 - Número de espécies isoladas conforme os grupos e voluntários.

Total de cepas: 387	Grupo 1 - Cárie Ativa							(n=8)
N.º Voluntário	1	2	4	5	6	10	11	12
<i>S. sobrinus</i>	03	00	04	03	03	00	13	00
<i>S. mutans</i>	46	45	45	43	43	52	38	49
# Isolados	49	45	49	46	46	52	51	49

Total de cepas: 365	Grupo 2 - Cárie Paralisada (n=8)							
N.º Voluntário	3	7	8	9	13	14	15	16
<i>S. sobrinus</i>	00	02	02	00	00	02	04	03
<i>S. mutans</i>	34	49	36	43	51	45	46	48
# Isolados	34	51	38	43	51	47	50	51

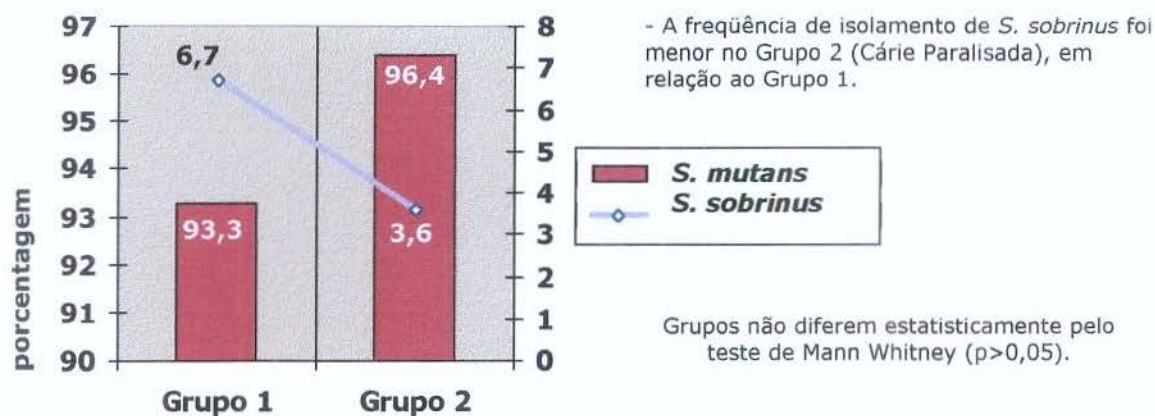


Gráfico 01 - Frequência de isolamento em porcentagem.

Neste estudo não foi observada diferença estatística entre o perfil de colonização por *S. mutans* e *S. sobrinus* entre lesões de cárie iniciais ativas e paralisadas.

A maioria das amostras isoladas foi identificada como sendo a da espécie *S. mutans*, em semelhança aos dados obtidos por outros autores (BRATTHALL & KÖHLER, 1976; MARFORT *et al.*, 1980; THOMSON *et al.*, 1980). Esses dados, analisados separadamente, confirmam a predominância de *S. mutans* nas populações de modo geral (CAUFIELD, 1997; DAVEY & ROGERS, 1984; HIROSE *et al.*, 1993; KÖHLER & BJARNASON, 1987; LOESCHE, 1993; TORRES *et al.*, 1991; VAN HOUTE, 1994).

6.2 CONTAGEM DE ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS:

As contagens de estreptococos grupo *mutans* foram feitas em todos os sítios coletados, para ter uma melhor quantificação do nível de colonização na cavidade bucal.

O gráfico 02 ilustra a média de unidades formadoras de colônia (UFC) por paciente de cada grupo. O maior valor obtido foi de $4,4 \times 10^5$ UFC/ml. A média aritmética dos grupos está representada pela linha, e em termos numéricos foi de $1,09 \times 10^5$ UFC/ml (Grupo 1) e $1,7 \times 10^4$ UFC/ml (Grupo 2).

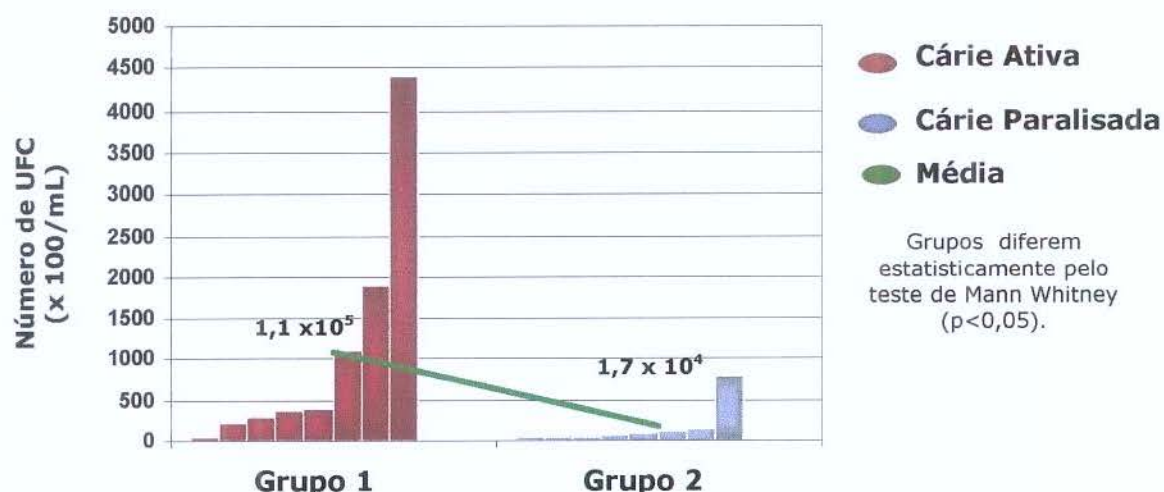


Gráfico 02 - Média das unidades formadoras de colônia (UFC) de EGM por paciente e média do grupo.

Concluimos que o grupo com cárie paralisada (Grupo 2) apresentou menores quantidades de estreptococos grupo *mutans*, por voluntários e por sítios, quando comparados ao grupo 1, diferindo estatisticamente (Teste de Mann Whitney $p < 0,05$).

Nossos achados estão de acordo com estudos semelhantes descritos na literatura, que demonstram uma alta frequência de isolamentos positivos de

estreptococos grupo mutans isolados de indivíduos cárie-ativos, quando comparados com outro grupo composto por indivíduos livres de cárie (GAO, *et al*, 2001; HÖFLING *et al.*, 1999; KLOCK & KRASSE, 1978; SHKLAIR & KEENE, 1974;)

6.3 RELAÇÃO ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS X ESTREPTOCOCOS TOTAIS:

SHKLAIR & KEENE (1974) demonstram uma baixa frequência de isolamentos positivos de estreptococos grupo mutans e uma baixa porcentagem dessa espécie em relação aos estreptococos totais isolados de indivíduos livres de cárie, quando comparados com outro grupo composto por indivíduos cárie-ativos (CPOD = 10,5).

De acordo com a literatura, existe uma relação direta entre o número de estreptococos na saliva e o número de sítios intra-orais colonizados (TOGELIUS *et al.*, 1984; DASANAYAKE *et al.*, 1995). Sendo portanto realizada a determinação da quantidade de estreptococos totais presentes na saliva dos voluntários. Computamos crescimento positivo de em média 114 colônias de *Streptococcus sp* em meio de cultura (MSA) na diluição mais concentrada (10^{-1}) dos voluntários do grupo 1 (Cárie Ativa, Sítio: Saliva). No grupo 2 (Cárie Paralisada, Sítio: Saliva), a mesma média foi levemente menor (96 colônias). No mesmo sítio o crescimento em MSB médio (estreptococos do grupo mutans) foi de 28 colônias (Grupo 1) e 17,5 colônias (Grupo 2).

Para a análise estatística estes valores foram normalizados para UFC/ml e utilizado a média da contagem em duplicata.

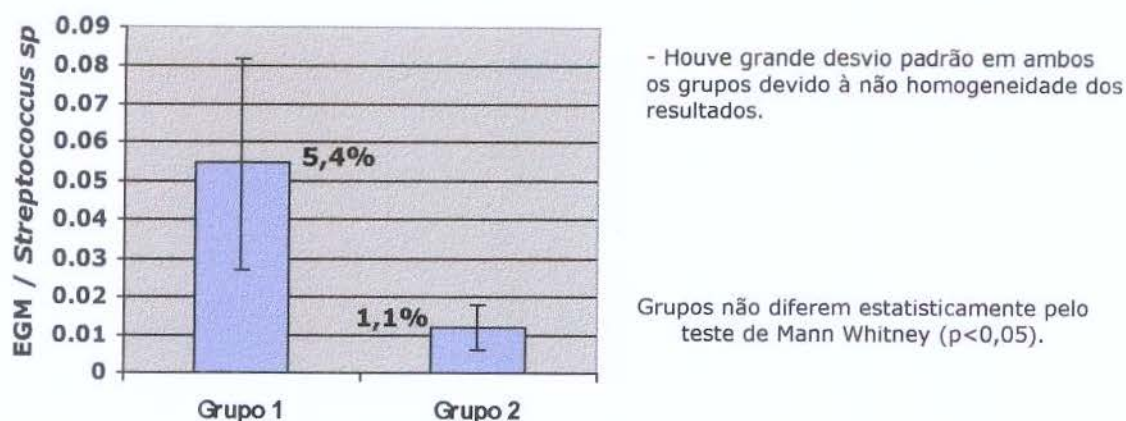


Gráfico 03 - Relação entre EGM/*Streptococcus sp* presente na saliva dos voluntários.

Conforme pode ser verificado no gráfico, este há a sugestão de que escolares com lesões de cárie paralisadas (G2) apresentam em sua microbiota uma menor quantidade de estreptococos do grupo mutans e estreptococos totais quando comparada ao grupo cárie ativo (G1), sendo porém a sua relação levemente menor e não estatisticamente significativa (teste de Mann Whitney, $p > 0,05$).

6.4 DECRÉSCIMO DE PH:

KOHLER *et al.* (1995) estudando queda de pH provocada por *S. mutans* em crianças, concluíram que é difícil relacionar a produção de ácido *in vitro* aos processos de cárie *in vivo*. Já MACPHERSON *et al.* (1992) avaliando o potencial cariogênico de *S. mutans* isolados de indivíduos com diferentes experiências de cárie através da medição de pH concluem que a experiência de carie dos indivíduos estudados pode ser relacionada, em alguma extensão, ao potencial cariogênico (produção de ácido) de suas cepas de *S. mutans*.

Resultados interessantes foram encontrados por NAPIMOGA *et al.* (2001), que observaram diferenças na queda do pH nos intervalos de 3, 6 e 12 horas de cepas de *S. mutans* isoladas de grupos de pacientes adultos cárie ativos quando comparados com as de livres de cárie. No mesmo estudo a comparação entre cepas de *S. sobrinus* não resultou em diferenças estatísticas.

Na análise do potencial cariogênico, foram selecionadas aleatoriamente 50 amostras de *S. mutans* de todos os pacientes de cada grupo, totalizando 100 cepas. A análise estatística foi baseada nas medições em triplicata comparando-se os grupos usando-se o teste de Kruskal-Wallis (NAPIMOGA *et al.* 2001).

Observamos diferentes perfis de queda de pH dos isolados, sendo que as cepas de *S. mutans* do G1 (Cárie Ativa) mostraram uma maior capacidade de redução do pH do meio, nos períodos de 6 e 12 horas, estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em comparação com as cepas do G2 (Cárie Paralisada).

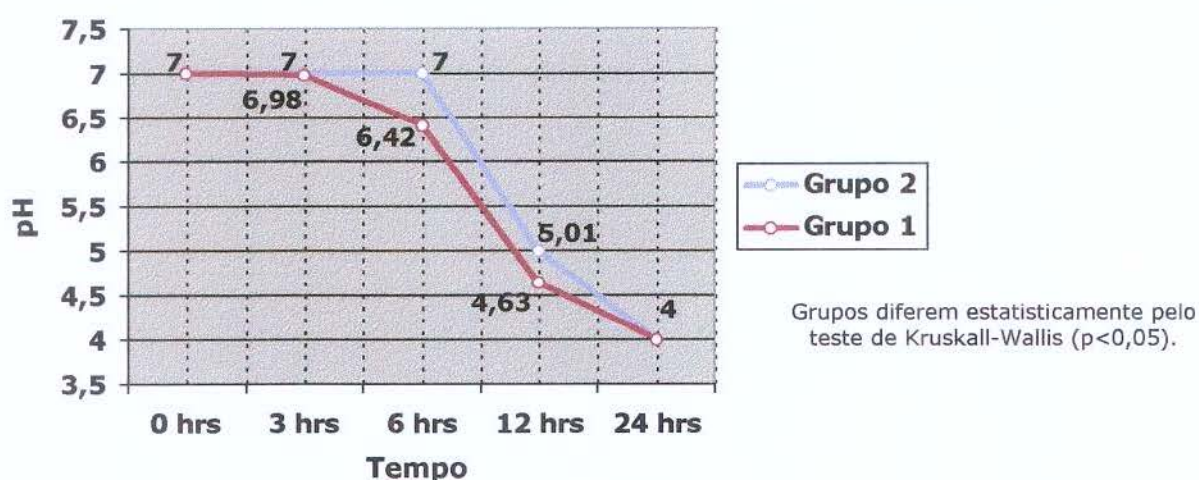


Gráfico 04 - Decréscimo de pH em função do tempo.

Os resultados deste estudo sugerem que existam diferenças nos fatores de virulência apresentados por microrganismos isolados de lesões ativas ou

paralisadas. Mais estudos relacionados à virulência desses microrganismos poderiam complementar esta questão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AZEVEDO, R.V.P.: O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans". *Tese (Doutoramento) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo*, p. 110, 1988.
2. BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R. & THOMAS, H.E.: The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5- to 8-year-old Hampshire schoolchildren. *Br Dent J.*, v. 162, n. 3, p. 103-106, 1987.
3. BOWDEN, G.H.: Does assessment of microbial composition of plaque & saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals?. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 25, p. 76-81, 1997.
4. BRATTHALL, D. & KÖHLER, B.: *Streptococcus mutans* serotypes: some aspects of their identification, distribution, antigenic shifts and relationship to caries. *J. Dent. Res.*, v. 55 (special issue C), p. 15-21, 1976.
5. BRETZ, W.A.; DJAHJAH, C; ALMEIDA, R.S.; HUJOEL, P.P. & LOESCHE, W.J.: Relationship of microbial and salivary parameters with dental caries in Brazilian pre-school children. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 20, p. 261-264, 1992.
6. BUISCHI, Y. & AXELSSON, P.: Controle mecânico da placa dental realizado pelo paciente. *ABOPREV – Promoção de Saúde Bucal*. Ed. Artes Médicas, Capítulo 6, 1997.
7. BURT, B.A.; ISMAIL, A.I. & EKLUND, S.A.: Root caries in optimally fluoride and high-fluoridated community. *J. Dent. Res.*, v. 65, p. 1154-1158, 1986.
8. CARLSSON, J.: A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontol Revy.*, v. 9, n. 2, p. 137-160, 1968.
9. CARVALHO, J. C. & MALTZ, M.: Tratamento da Doença Cárie. *ABOPREV – Promoção de Saúde Bucal*, Artes Médicas, p. 93-113, 1997.

10. CAUFIELD, P.W.: Dental caries – a transmissible and infectious disease revised: a position paper. *Pediatr. Dent.*, v. 19, p. 491-498, 1997.
11. DASANAYAKE, A.P.; CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R. & STILES, H.M.: Transmission of mutans streptococci to infants following short term application of an iodine-NaF solution to mothers' dentition. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 21, n. 3, p. 136-142, 1993.
12. DASANAYAKE, A.P.; ROSEMAN, J.M.; CAUFIELD, P.W. & BUTTS, J.T.: Distribution and determinants of mutans streptococci among African-American children and association with selected variables. *Pediatr. Dent.*, v.17, n. 3, p. 192-198, 1995.
13. DAVEY, A. L. & ROGERS, A. H.: Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Arch. Oral Biol.*, v. 29, n. 6, p. 453-460, 1984.
14. DE SOET, J.J.; VAN LOVEREN, C.; LAMMENS, A.J.; HOMBURG, C.H.E.; PAVICIC, M.J.A.M.P.; TEN CATE, J.M. & DE GRAAFF, J.: Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, v. 25, p. 116-122, 1991.
15. GAO, X.J.; FAN, Y.; KENT, R.L. JR.; VAN HOUTE, J. & MARGOLIS, H.C.: Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J. Dent. Res.*, v. 80, n. 9, p. 1834-1839, 2001.
16. GRANER, R.O.M.: Relação entre os níveis bucais de estreptococos do grupo mutans, alguns de seus fatores de virulência e a incidência de cárie dental em crianças de 12 à 30 meses de idade. *Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia da USP.*, São Paulo, p. 155, 1999.
17. GRAY, G.B. & PATERSON, R.C.: Prediction of the extent of caries in pit and fissure lesions in a field trial in the west of Scotland. *Caries Res.*, v. 31, n. 5, p. 329-335, 1997.
18. HARDIE, J.M.: Oral Streptococci. In BERGEY DH: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, sec. 12, p. 1054-1063, 1986.
19. HIROSE, H.; HIROSE, K.; ISOGAI, E.; MIURA, H. & UEDA, I.: Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries Res.*, v. 27, p. 292-297, 1993.

20. HÖFLING, J. F.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R. & MOREIRA, D.: Association *between* *Streptococcus mutans*/*Streptococcus sobrinus* in students of different social levels and their relationship with the cariogenic activity of these populations. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, v. 13, n. 2, p. 173-180, 1999.
21. KLOCK, B. & KRASSE, B.: Effect of caries-preventive measures in children with high numbers of *S. mutans* and lactobacilli. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 86, n. 4, p. 221-230, 1978.
22. KÖHLER, B. & BJARNASON, S.: Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v. 15, n. 6, p. 332-335, 1987.
23. KÖHLER, B. & KRASSE, B.: Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 5, p. 177-180, 1990.
24. KÖHLER, B.; BIRKHED, D. & OLSSON, S.: Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res.*, v. 29, n. 5, p. 402-406, 1995.
25. LINDQUIST, B. & EMILSON, C.G.: Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. *Caries Res.*, v. 25, p. 146-152, 1991.
26. LOESCHE, W.J.: Cárie dental - Uma infecção tratável. *Rio de Janeiro, Cultura Médica*, p. 349, 1993.
27. MACPHERSON, L.M.; MACFARLANE, T.W.; GEDDES, D.A. & STEPHEN, K.W.: Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to in vivo caries experience. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 7, n. 3, p. 142-147, 1992.
28. MÅNSSON, B.: Caries Progression in the first permanent molars: A longitudinal study. *Swed. Dent. J.*, v. 1, p. 185-191, 1977.
29. MARFORT, R. A.; BOGARELLI, M. I. & PIOVANO, S. H.: Identificación morfológica, bioquímica y serológica de *S. mutans* en placa dental de niños. *Rev. Assoc. Odontol.*, v. 2, n. 2, p. 42-45, 1980.

30. MAYER, M.P.A.; BUENO, L.C.; HANSEN, E.J. & DIRIENZO J.M. Identification of a cytolethal distending toxin gene locus and features of a virulence-associated region in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.*, v. 67, n. 3, p. 1227-1237, 1999.
31. MENEGHIM, M.C.: Condições de saúde bucal dos grupos de 3º idade de Piracicaba/SP:1998. *Tese (Doutoramento), UNESP, Faculdade de Odontologia Araçatuba*, p. 124, 1999.
32. MITCHELL, L. & MURRAY, J.J.: Fissure sealants: a critique of their cost-effectiveness. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 17, p. 19-23, 1989.
33. MUNDORFF, S.A; EISENBERG, A.D; LEVERETT, D.H; ESPELAND, M.A. & PROSKIN, H.M.: Correlations between numbers of microflora in plaque and saliva. *Caries Res.*, v. 24, p. 312-317, 1990.
34. MUSSER, J.M.; KROLL, J.S.; MOXON, E.R. & SELANDER, R.K.: Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus Influenza*. *Infect Immun*, v. 56, n. 8, p. 1837-1845, 1988.
35. NAPIMOGA, M.H.; STIPP, R.N.; ROSA, R.T.; HÖFLING, J.F.& GONÇALVES, R.B.: Potencial cariogênico de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* isolados de voluntários livres de cárie e cárie-ativos. In. 18ª REUNIÃO ANUAL SBPqO, Águas de Lindóia Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 15, p. I-200, 2001.
36. NIVEN Jr., C.F.; SMILEY, K.L. & SHERMAN, J.M.: The production of large amounts of a polysaccharide by *S. salivarius*. *J. Bacteriol.*, v. 41, p. 479-484, 1942.
37. OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M. & KOGA, T.: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 15, p. 258-262, 2000.
38. PEREIRA, A.C. & MOREIRA, B.H.W.: Diagnóstico da Cárie dentária: estudo comparativo de diferentes métodos de exame odontológicos. *RGQ*, v. 43, p. 127-131, 1995.
39. PEREIRA, C.V.: Potencial cariogênico *in vitro* de estreptococos grupo mutans da cavidade bucal e seu significado em relação a cárie dental. *Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba*, p. 91, 1998.

40. PINTO VG: Saúde Bucal - Odontologia Social e Preventiva. *São Paulo: ed. Santos*, p. 415, 1995.
41. SHKLAIR, I.L. & KEENE, H.J.: A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. *Archs. Oral Biol.*, v. 19, p. 1079-1081, 1974.
42. THOMSON, L. A.; LITTLE, W. A. & BOWEN, W. H.: Prevalence of *S. mutans* serotypes, *Actinomyces* and other bacteria in the plaque of children. *J. Dent. Res.*, v. 59, n. 10, p. 1581-1589, 1980.
43. THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O.: Cariologia Clínica. *Editora Santos. São Paulo*, p. 421, 1995.
44. TOGELIUS, J.; KRISTOFFERSSON, K.; ANDERSON, H. & BRATTHALL, D.: Streptococcus mutans in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. *Acta Odontol. Scand.*, v. 42, n. 3, p. 157-163, 1984.
45. TORRES, S. A.: Avaliação do ágar SB-20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo *mutans* na saliva e na placa dental de adolescentes. *Tese (Doutoramento) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo. Araraquara*, p. 124, 1991.
46. VAN HOUTE, J.: Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, v. 73, p. 672-681, 1994.
47. WEERHEIJM, K.L.: Sealing of occlusal hidden caries lesions: an alternative for curative treatment? *ASDC J Dent Child.*, v. 59, n. 4, p. 263-268, 1992.
48. WHILEY, R.A. & BEIGHTON, D.: Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 13, p. 195-216, 1998.
49. WHITTENBURY, R.: Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v. 35, p. 13-26, 1964.