

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTREPTOCOCOS CARIOGÊNICOS EM SANTA MARIA, R. S., BRASIL *

Tabajara G. da COSTA **
Flavio GAIDA **
Luiz C. BIER **

RSPSP-128

COSTA, T. G. da et al. — Isolamento e caracterização de estreptococos cariogênicos em Santa Maria, RS, Brasil. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 6:167-70, 1972.

RESUMO: A presença de *Streptococcus* semelhantes aos *Streptococcus mutans*, supostos indutores de cárie, foi demonstrada em nosso ambiente. A investigação relativa à morfologia colonial, bem como das atividades bioquímicas destes microrganismos sugere que eles sejam idênticos àqueles demonstrados como cariogênicos para animais e seres humanos em diversas regiões do globo. Estas observações vêm consubstanciar a suposição de que a cárie dental seria uma doença bacteriologicamente específica.

UNITERMOS: *Streptococcus cariogênicos**; Cárie dental*; *Streptococcus mutans**.

1 — INTRODUÇÃO

As chamadas bactérias cariogênicas foram até agora isoladas de indivíduos residentes em diferentes posições do globo terrestre: ZINNER et al.¹³ (1965), BERMAN & GIBBONS¹ (1966), FITZGERALD & JORDAN³ (1968) nos Estados Unidos; KRASSE⁸ (1966) na Suécia; GIBBONS & LOESCHE⁶ (1967) na Guatemala; GUGGENHEIM⁷ (1966) na Suíça.

Sendo a cárie uma doença pandêmica e existindo bactérias especificamente cariogênicas, seria de esperar encontrar estes organismos onde existisse cárie. O objetivo desta investigação foi estudar esta possibilidade, procurando por bactérias semelhantes.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 — Isolamento de Bactérias Cariogênicas

Amostras de placa de 7 pacientes foram removidas, várias horas após as refeições, com escavadores odontológicos esterilizados e dispersas em tampão fosfato (0.067 M, pH 7.2), usando-se um homogeneizador de tecido. Diluições em série foram preparadas e 0.1 ml de amostra foi espalhada na superfície do meio *Streptococcus Mitis salivarius* e no meio Tripticase 2%, adicionado de extrato de levedura 0.2%, glicose 2%, e incubadas anaerobicamente em jarras de Brewer com 95% de nitrogênio e 5% de gás carbônico, por 48 a 72 horas.

Todas as placas foram examinadas, procurando-se por colônias rugosas, brilhantes, de morfologia semelhante àquelas descritas por FITZGERALD & KEYES⁴ (1960) e KRASSE⁸ (1966).

As placas de Tripticase — extrato de levedura — glicose, após incubação foram cobertas com iodo, para se deter-

* Trabalho realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisas.

** Do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Santa Maria, RS. — Brasil.

minar a percentagem de colônias exibindo a formação de polissacarídeo intracelular. (BERMAN & GIBBONS¹, 1966 e LOESCHE & HENRY⁹, 1967).

O crescimento no meio *Mitis-salivarius* foi examinado procurando-se por colônias mucóides. As colônias a exibirem um aspecto de gota de orvalho em sua superfície (KRASSE⁸, 1966) foram isoladas para posterior estudo.

2.2 — Identificação Bioquímica

As amostras isoladas na base da morfologia colonial foram testadas em relação às seguintes provas: habilidade de fermentar manitol e sorbitol, crescimento em presença de 0.1% de azul de metileno, hidrólise de amido, hidrólise da arginina e por sua habilidade de formar cápsulas a partir da sacarose. Esta aparência sob o aspecto aderente nas paredes dos frascos quando a bactéria era cultivada em caldo contendo 5 a 10% de sacarose, (GIBBONS & LOESCHE⁶, 1967).

2.3 — Identificação do polissacarídeo

2.3.1 — Métodos Químicos

O polissacarídeo extracelular foi separado pela vigorosa agitação das células cultivadas em caldo sacarose e, posteriormente, centrifugado para a remoção das mesmas. Adicionou-se um e meio volume de etanol ao sobrenadante para precipitar o polissacarídeo. Após a precipitação foi o mesmo coletado por centrifugação e lavado com etanol, sendo logo após dissolvido em água e ácido tricloroacético a concentração final de 10%, para purificação. A mistura assim obtida, foi submetida a centrifugação para a remoção das proteínas precipitadas e o sobrenadante dializado para a remoção do ácido tricloroacético.

O polissacarídeo foi analisado por métodos químicos usando-se o reagente (SCOTT & MELVIN¹¹, 1953) e os açúca-

res redutores pelo método de FOLIN & MALMROS⁵ (1929).

Ceto-hexoses foram determinadas usando-se cisteína, carbazole e ácido sulfúrico (DISCHE², 1953) e as proteínas estimadas pelo método de LOWRY et al.¹⁰ (1951). Após a hidrólise com ácido sulfúrico, foi feita a análise cromatográfica.

2.3.2 — Análise Cromatográfica

Amostras purificadas do polissacarídeo foram submetidas a hidrólise pelo ácido sulfúrico e analisadas cromatograficamente. Diluições do hidrolizado foram aplicadas a tiras de papel para cromatografia Tipo Watmann n.º 1, com o auxílio de micropipetas.

Após um período suficiente para que a substância secasse, os cromatogramas foram colocados a correr em câmaras cromatográficas usando-se como solvente ácido acético, metil acetato e água nas proporções de 3:3:1. Os pontos correspondentes a migração da substância em estudo foram visualizados borrifando-se uma solução de Anilina Ftalato (Merck-1266), reativo pulverizante para cromatografia, usado para comprovar a presença de açúcares redutores.

A leitura dos resultados foi facilitada pelo uso de lâmpadas ultravioleta, sendo os valores R_f a seguir calculados.

3. — RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 — Isolamento e Identificação das Bactérias Cariogênicas

Em todas as amostras examinadas foi possível observar a presença de estreptococos em altos números, muitos dos quais assemelhavam-se aos chamados *Streptococcus mutans*, supostos indutores de cáries. Algumas destas amostras foram selecionadas e identificadas bioquimicamente aos estreptococos cariogênicos.

Os resultados acumulados na literatura especializada e os alcançados na presente investigação sugerem maiores evidências de que a cárie dental seja uma doença bacteriologicamente específica, pois a semelhança entre os microrganismos isolados em nosso ambiente e aqueles já caracterizados através do globo, como indutores de cárie, é acentuada.

A determinação do percentual de mi-

croorganismos formadores de polissacarídeo intracelular revelou, conforme Tabela, corresponder a aproximadamente 58% nas amostras de placa estudadas. Sugere-se pois, a possibilidade de uma intensa atividade em relação a produção de ácidos, pelos membros da flora bacteriana da placa. Resultados semelhantes são encontrados na literatura especializada (VAN HOUTE¹², 1963).

T A B E L A
Microorganismos formados de polissacarídeo intracelular

Microrganismos por mg de material 10 ⁷	Número de colônias S.A.P. *	Porcentagem
1. 56	28	50%
2. 28	15	53.5%
3. 60	68	42.5%
4. 7	5	71%
5. 23	16	69.5%
6. 40	22	55%
7. 64	42	65.6%

* S.A.P. — Sintetizadores de Amilo Pectina.

3.2 — Formação de Polissacarídeo

Das amostras identificadas como semelhantes às cariogênicas, uma foi selecionada para a obtenção de polissacarídeo extracelular pelo cultivo em caldo sacarose a 10%. Após a incubação adequada, observou-se a formação de um abundante precipitado firmemente aderido às paredes do frasco de cultura, enquanto também foi possível observar que porções polissacarídicas ficavam em suspensão no meio de cultura.

Após a precipitação alcoólica e a conveniente purificação, a massa polissacarídica foi conservada em congelador.

Amostras deste polissacarídeo quando quimicamente analisadas demonstraram que a preparação é constituída de aproximadamente 105% de carboidrato com insignificantes quantidades de ceto-hexoses.

A análise cromatográfica do polissacarídeo, após a hidrólise ácida, revelou a presença de um maior percentual de glicose.

Os resultados das análises químicas e cromatográficas, permitem concluir que o polissacarídeo obtido em nosso laboratório é semelhante aos clássicos dextranos sintetizados pelas amostras cariogênicas de estreptococos.

3.3 — Análise sorológica

Experimentações empregando amostras purificadas do polissacarídeo convenientemente preparadas, foram feitas pela inoculação em ratos e coelhos, numa tentativa de obter-se anticorpos anti-dextrano. Não foram obtidos resultados significativos, o que veio confirmar observações de diversos autores, segundo as quais este polissacarídeo seria pouco imunogênico para animais de laboratório.

RSPSP-128

COSTA, T. G. da et al. — [Isolation and characterization of cariogenic streptococcus in Santa Maria, RS, Brazil]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 6:167-70, 1972.

SUMMARY: *The presence of Streptococcus resembling Streptococcus mutans supposed caries inductors, was demonstrated in on environment. Colonial morphology and biochemical characteristics of these microorganisms suggest some identity to those already demonstrated as cariogenic to animals and humans throughout the world. These observations brought some support to the hypothesis that caries would be a bacteriologically specific disease.*

UNITERMS: *Streptococcus, cariogenic*;* *Dental caries*;* *Streptococcus mutans*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERMAN, K. S. & GIBBONS, R. J. — Iodophilic polysaccharide synthesis by human and rodent oral bacteria. *Arch. oral Biol.*, 11:533-42, 1966.
2. DISCHE, Z. — New color reaction for determination of sugars in polysaccharide. *Meth. biochem. Anal.*, 2:313-53, 1955.
3. FITZGERALD, R. J. & JORDAN, H. V. — Polysaccharide producing bacteria and caries. In: HARRIS, R. S. ed. *Art. and science of dental caries research*. New York, Academic Press, 1968.
4. FITZGERALD, R. J. & KEYES, P. H. — Demonstration of etiologic role of streptococci in experimental caries in hamsters. *J. Amer. dent. Ass.*, 61:9-19, 1960.
5. FOLIN, O. & MALMROS, H. — An improved form of Folin's micro method for blood sugar determinations. *J. biol. Chem.*, 83:115-20, 1929.
6. GIBBONS, R. J. & LOESCHE, W. J. — Isolation of cariogenic streptococci from Guatemalan children. *Arch. oral Biol.*, 12:1013-14, 1967.
7. GUGGENHEIM, B. et al. — The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested on rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracellular polysaccharide. *Helv. odont. Acta*, 10:101-13, 1966.
8. KRASSE, B. — Human streptococci and experimental caries in hamsters. *Arch. oral Biol.*, 11:429-36, 1966.
9. LOESCHE, W. J. & HENRY, C. A. — Intracellular microbial polysaccharide production and dental caries in a Guatemalan Indian village. *Arch. oral Biol.*, 12:189-94, 1967.
10. LOWRY, O. H. et al. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
11. SCOTT, T. A. & MELVIN, E. H. — Determination of dextran with anthrone. *Analyt. Chem.*, Washington, 25:1656-61, 1953.
12. VAN HOUTE, J. — *Relationship between carbohydrates intake and the proportion of iodophilic polysaccharide storing microorganisms in dental plaque*. Chicago, International Association for Dental Research, 1963. p. 73.
13. ZINNER, D. D. et al. — Experimental caries induced by streptococcus of human origin. *Proc. Soc. exp. Biol.* 118:766-70 1965.

Recebido para publicação em 24-3-1972

Aprovado para publicação em 25-4-1972