

Avaliação comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* e estudo da transmissão

Comparative study on PCR and fenotypic on the detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and transmission study

Patrícia AMOROSO

Doutora em Microbiologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP

Tereza Cristina Costa FRANCO E FRANCO

Mestranda – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP

José Moacir MARIN

Professor Assistente Doutor – Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Fernando Antonio de ÁVILA

Professor Titular – Departamento de Patologia Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal – UNESP

RESUMO

O objetivo deste estudo foi detectar *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* na saliva e biofilme dentário de famílias que possuem crianças com idade pré-escolar pelas técnicas da PCR e pela fenotipagem. Foi realizado isolamento de estreptococos do grupo mutans em seis famílias, de amostras de biofilme dentário e saliva, através de semeadura em meio de cultura SB20. Essas amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram identificadas por meio das características das colônias em ágar sangue, esfregaços corados pelo Gram e testes bioquímicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando *primers* para amplificação do gene da glicosiltransferase. *Streptococcus mutans* foi detectado no biofilme dentário pela técnica de PCR de vinte (90,9%) membros e não foi encontrado em apenas duas (9,0%) pessoas, que apresentaram *Streptococcus sobrinus*. Na saliva, pela técnica do PCR foram identificadas vinte (90,9%) pessoas com *Streptococcus mutans* e três (13,6%) pessoas com *Streptococcus sobrinus*. Pelos resultados pode-se concluir que o método do PCR (PCR-multiplex) pode ser mais uma ferramenta na identificação dos estreptococos do grupo mutans. Também poderá ser utilizado em estudos da transmissão intrafamiliar destes microrganismos. A especificidade da PCR em relação ao método de cultivo para amostras de biofilme dentário que continham *Streptococcus mutans* foi de 66,67% e a sensibilidade de 100%, e para amostras de saliva a sensibilidade foi de 95% e a especificidade de 50%. A especificidade para detecção de *Streptococcus sobrinus* para amostras de saliva foi de 95% e de biofilme dentário de 100%, enquanto que a sensibilidade para amostras de saliva foi 100% e de biofilme dentário foi 50%. Foi verificado também que há uma correlação positiva entre o número de *Streptococcus* do grupo *mutans* na saliva das mães e seus respectivos filhos ($r=0,7015$, $p<0,01$).

UNITERMOS

Streptococcus mutans, *streptococcus sobrinus*, reação em cadeia da polimerase; placa dentária; saliva

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é um problema de saúde pública mundial, é transmissível e causada por bactérias bucais, principalmente *Streptococcus mutans* (AZEVEDO et al.², 1998; PIMENTA et al.²⁰, 2001).

O grupo *mutans*, que compreende bactérias cariogênicas, possui sete espécies: *Streptococcus cri-cetus*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus* e *Streptococcus macacae* (WHILEY & BEIGHTON²⁶, 1998; NAKANO et

al.¹⁵, 2004). Destas espécies, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são mais freqüentemente isolados da cavidade bucal humana (WHILEY & BEIGHTON²⁶, 1998), e estas duas espécies são as principais causadoras da cárie dentária humana. A distinção entre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* é importante porque os dois microrganismos têm diferentes mecanismos de colonização e virulência. O *Streptococcus mutans* é uma bactéria Gram positiva, microaerófila, apresenta-se como cocos em cadeia, não hemolítico, produtor de polissacarídeos (glucanas) extra e intracelulares (AZEVEDO¹, 1988).

Necessita-se para estudos epidemiológicos da cárie um método de identificação e diferenciação entre estes microrganismos rápido, sensível e simples. Vários métodos são utilizados para identificação destas espécies isoladas da cavidade bucal, tais como, os métodos bioquímicos, imunológicos e genéticos (IGARASHI et al.⁹, 2001).

Muitas técnicas são utilizadas conjuntamente para se obter confiabilidade na identificação da espécie. Isto requer tempo e habilidade considerável e muitas vezes os resultados são insatisfatórios (TRUONG et al.²⁵, 2000).

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus* eram classificados em base nas características taxonômicas tais como morfologia das colônias, antígenos polissacarídicos, sorologicamente e por fermentação de substratos (LI et al.¹³, 2001).

Hoje é aceita a caracterização da espécie por testes baseados no DNA pois, a fenotipagem é reflexo da expressão gênica (TRUONG et al.²⁵, 2000). Na taxonomia por biotipagem e fenotipagem nem todas as cepas de uma espécie tem resultado positivo para uma dada característica (LI & CAUFIELD¹³, 2001). Recentemente a reação da polimerase em cadeia (PCR) foi introduzida para resolver estes problemas. Atualmente testes relacionados a genotipagem estão sendo mais utilizados pela possibilidade de serem mais sensíveis e específicos (YOSHIDA et al.²⁸, 2003).

Em *Streptococcus mutans*, primers para a técnica da PCR podem ser obtidos através de genes que codificam antígenos protéicos de superfície wapA e SpA, (ONO et al.¹⁸, 1994) e dextranase (IGARASHI et al.⁹, 2001). Estes foram os primeiros alvos para identificar especificamente *Streptococcus mutans* por PCR (IGARASHI et al.⁹, 2001).

Glucanas insolúveis facilitam o acúmulo de *Streptococcus mutans* na superfície dentária e a sua

agregação intercelular via receptores da superfície celular (HAMADA & SLADE⁸, 1980; LI & CAUFIELD¹², 1995).

Streptococcus mutans secretam três tipos de glicosiltransferase (GTF-I, GTF-SI, GTF-S). O gene *gtfB* codifica a enzima GTF-I a qual participa da síntese de glucano a partir da sacarose (OHO et al.¹⁶, 2000). *Streptococcus sobrinus* secretam quatro tipos de glicosiltransferase (GTF-I, GTF-S, GTF-SA, GTF-SB) e o gene *gtfI* codifica a enzima GTF-I, que participa da síntese de glucanos insolúveis em água (OKADA et al.¹⁷, 2002). Os primers utilizados por (OHO et al.¹⁶, 2000) foram desenvolvidos utilizando seqüências nucleotídicas do gene *gtfB* de *Streptococcus mutans* e de *gtfI* de *Streptococcus sobrinus*, específicos para cada espécie. Os primers para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram misturados em uma única reação de PCR (OHO et al.¹⁶, 2000) e as duas espécies foram perfeitamente diferenciadas.

O objetivo deste estudo foi detectar *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* na saliva e biofilme dentário de famílias que possuem crianças com idade pré-escolar pelas técnicas da PCR e identificação por testes bioquímicos. Procurou-se também estabelecer a comparação entre as duas técnicas de detecção para estes microrganismos. Outro objetivo foi verificar a correlação entre os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva das crianças e de suas mães.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participaram neste trabalho 79 crianças de cinco a seis anos de idade (quarenta crianças com cárie, e 39 sem cárie), de duas CEMEIs (Centro Educacional Municipal de Ensino Infantil) da cidade de Barretos, estado de São Paulo durante o ano de 2002. Das crianças sem cárie foram selecionadas seis famílias (pais e irmãos), com pelo menos uma criança da família com idade pré-escolar (faixa etária de cinco, seis anos de idade) e com dentição mista. Foi obtida a aprovação para o estudo da Secretaria de Saúde assim como o consentimento dos pais para a participação no estudo. As famílias foram submetidas a um exame odontológico para verificar a presença de cáries em uma unidade dental, usando o critério da OMS (Organização Mundial de Saúde) para diagnóstico e código de cárie (LEITE et al.¹¹, 1999). O exame clínico foi realizado com luz natural utilizando-se espelho plano.

Sonda exploradora (nº 5) foi utilizada para a coleta de biofilme dentário com a raspagem da porção cervical do dente. A experiência de cárie foi obtida pela soma dos dentes cariados, extração indicada e obturados (ceo) para as crianças com dentição mista

e para os demais foi obtida por meio do CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados), calculados pelas fórmulas abaixo. Foi considerado o número de no mínimo uma lesão de cárie para que a pessoa seja incluída no grupo com cárie.

Ceo = c (cariado)+ Ei (extração indicada) + o (obturado)

$$\text{Ceo} = \frac{c + E_i + o}{\text{N}^\circ \text{ de crianças examinadas}}$$

$$\text{CPOD} = \frac{C + P + O}{\text{N}^\circ \text{ de pessoas examinadas}}$$

Tabela 1 - Famílias, número e idade de filhos sem cárie, idade dos pais e dos irmãos que participaram deste estudo, na cidade de Barretos-SP, em 2002

FAMÍLIA	PAIS (IDADE EM ANOS)	FILHO SEM CÁRIE (IDADE EM ANOS)	IRMÃOS (IDADE EM ANOS)
1	*M1-(43) **P1-(48)	***F1-(5)	****I1-(16)
2	M2-(37) P2-(51)	F2-(6)	I2-(14)
3	M3-(36) P3-(41)	F3-(6)	-
4	M4-(33) P4-(36)	F4-(6)	-
5	M5-(41) P5-(48)	F5-(6)	I5-(12)
6	M6-(34) P6-(38)	F6-(5)	I6-(7)

*M-mãe; ** P-pai; ***F-Filho; ****I-irmão.

Coleta de biofilme dentário e saliva

Um *pool* de biofilme dentário supragengival da região cervical (lingual e vestibular) dos dentes posteriores foi removido com auxílio de sonda exploradora de ponta romba esterilizada. Cada sonda ex-

ploradora foi imediatamente colocada em um tubo estéril com PBS (solução fosfatada tamponada) com pH 7,0 e pérolas de vidro. As amostras coletadas foram processadas em laboratório após 2-3 horas da coleta. A sonda exploradora foi vigorosamente agitada antes de removida, e o tubo foi submetido

a agitação no vortex por 30 segundos para homogeneizar a amostra. Um volume de 0,1mL foi disperso em ágar SB20 (sacarose bacitracina 20%) (DAVEY & ROGERS⁵, 1984) modificado por (AZEVEDO¹, 1988). As placas de Petri foram incubadas em microaerofilia, pelo método da vela, por três dias a 37° C. Para saliva, foram coletados aproximadamente 2mL não estimulada dentro de tubo de ensaio estéril contendo pérolas de vidro. Estes foram agitados em vortex por 30 segundos para homogeneizar as amostras de saliva. Estas amostras foram submetidas à diluição decimal até 10⁻⁶ em solução salina esterilizada. Alíquotas de 0,1mL foram depositadas no centro de placas, contendo o meio de ágar SB20, e espalhadas de forma homogênea com auxílio de bastão de vidro angulado e esterilizado. Em seguida, as placas foram incubadas em microaerofilia, pelo método da vela, a 37°C por três dias. Após a incubação foi realizada a contagem de bactérias na forma de unidades formadoras de colônia (UFC).

Exame bacteriológico

Após a incubação, placas contendo colônias de estreptococos isolados de amostras de saliva e de biofilme dentário foram observadas sob um microscópio estereoscópio, e todos os tipos de colônias com morfologias diferentes, até cinco colônias por indivíduo, foram subcultivados para confirmar a presença de *Streptococcus mutans* ou *Streptococcus sobrinus*. Estes subcultivos foram utilizados para obtenção de cultura pura e posterior identificação da espécie.

Foram isoladas 1280 colônias do grupo *mutans* (até cinco colônias por indivíduo) onde 256 isolados (128 de amostras de saliva e 128 isolados de biofilme dentário) foram submetidas à diferenciação entre espécies de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

As amostras de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram identificadas por meio das características das colônias em ágar sangue, esfregaços corados pelo método de Gram e testes bioquímicos de fermentação de vinte tipos de carboidratos ou poliálcoois diferentes sendo os principais o manitol, o sorbitol, a melibiose e a rafinose; teste de hidrólise de arginina, teste de resistência a bacitracina e produção do peróxido de hidrogênio e catalase (SKLAIR & KENEE²², 1974; QURESHI et al. ²¹, 1977; HAMADA & SLADE⁸, 1980; DAVEY & ROGERS⁵, 1984).

EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL E PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

DNA cromossomal foi extraído como descrito por Kulkarni et al.¹⁰, (1989). As células foram lavadas em tampão Tris 0,1 M, tratadas com lisozi-ma, lisadas com 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e purificadas com fenol clorofórmio. O DNA foi precipitado com acetato de sódio e etanol. *Primers* de oligonucleotídeo GTFB-F 5' – ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG e GTFB-R 5'- CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC foram utilizados para amplificar 517 pb-fragmentos de DNA para a sequência de *gtfB* de *Streptococcus mutans*, e *primers* GTFI – 5' GATAACTACCTGACAGCTGACT e GTFI – R 5' – AAGCTGCCTTAAGGTAATCACT foram utilizados para amplificar 712 pb de fragmentos de DNA na sequência *gtfI* para *Streptococcus sobrinus*. A mistura de PCR foi a mesma usada por OHO et al.¹⁶ (2000). O termociclador utilizado foi o modelo Mastercy Cler Personal 5332, marca eppendorff. As condições para o PCR foram: desnaturação a 95°C por 30 segundos, seguida por anelamento a 59°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto. Esta amplificação foi repetida por 30 ciclos. O ciclo final compreendeu 72°C por 5 minutos. Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, com fixação de brometo de etídio.

A determinação da especificidade e da sensibilidade da PCR em relação a série bioquímica foi realizada por meio de análise estatística segundo Thorner & Remein²³ (1961). Foi realizado também a média, desvio padrão e a correlação por meio do teste t (teste t de *Student*) entre os níveis de *Streptococcus* na saliva das crianças e de suas respectivas mães.

RESULTADOS

No exame odontológico das crianças foi obtido o índice ceo igual a 2,5. Quanto ao CPOD aplicado ao exame dental dos adultos, foi obtido o valor deste índice igual a 19,08.

Todas as seis famílias (22 pessoas) apresentaram o grupo *mutans* na saliva e biofilme dentário pela técnica da PCR e pelo perfil bioquímico. *Streptococcus mutans* foi detectado no biofilme pela técnica de PCR de 20 (90,9%) membros e não foi encontrado em apenas duas (9,0%) pessoas, as quais apresentaram *Streptococcus sobrinus* (Tabela 2).

Na saliva, pela técnica do PCR foram identificadas vinte (90,9%) pessoas com *Streptococcus mutans* e três (13,6%) pessoas com *Streptococcus sobrinus*. Um pai (família 1) albergava *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* em amostra de saliva (técnica de PCR), ou seja, apresentou a cavidade bucal multicolonizada (Tabela 2). Também nesta mesma família foi encontrado uma filha com *Streptococcus sobrinus* na saliva pela técnica de PCR (Quadro 1).

Pelo perfil bioquímico foram identificados *Streptococcus mutans* 81,82% (18) em amostras do biofilme dentário e em 90,91% (20) amostras de saliva. *Streptococcus sobrinus* foi detectado pela técnica de cultivo em 18,18% (4) amostras de biofilme dentário e 2 (9,09%) amostras de saliva.

Na família 6, foi observado pelo método de fenotipagem (Quadro 1) que o pai e um filho (I6) apresentaram *Streptococcus sobrinus* no biofilme dentário enquanto na saliva apresentaram *Streptococcus mutans*. Apenas duas famílias (2 e 4), pela fenotipagem, apresentaram tanto na saliva quanto na placa dental *Streptococcus mutans*, ou seja, monocolonizados (Quadro 1).

Na Tabela 4 encontra-se a média, desvio padrão e correlação de UFC/mL de estreptococos do grupo mutans na saliva dos filhos e de suas mães (79 pares mãe-filho). A correlação entre o número de UFC/mL de estreptococos do grupo mutans na saliva das mães e filhos foi significativa para o grupo de crianças que apresentaram cárie e foi não significativa para o grupo de crianças sem cárie.

Quadro 1 - Identificação de *Streptococcus* do grupo *mutans* pela PCR e fenotipagem de amostras de placa e saliva de 6 famílias da cidade de Barretos (SP), 2003

FAMÍLIA	PCR		CULTIVO	
	PLACA DENTAL	SALIVA	PLACA DENTAL	SALIVA
**P1	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i> + <i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
*M1	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
***F1	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
****I1	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
P2	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
M2	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
F2	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
I2	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
P3	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
M3	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
F3	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
P4	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
M4	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
F4	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
P5	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
M5	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
F5	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
I5	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
P6	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>
M6	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
F6	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
I6	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>

*M-mãe; ** P-pai; ***F-Filho; ****I-irmão.

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade dos testes da PCR em relação à fenotipagem para detecção de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* na placa dental e saliva de 6 famílias da cidade de Barretos (SP), 2003

Identificação	Placa		Saliva	
	*S%	*E%	S%	E%
<i>S. mutans</i>	100,00	66,67	95,00	50,00
<i>S. sobrinus</i>	50,00	100,00	100,00	95,00

*S: sensibilidade; *E: especificidade.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e correlação entre contagem (ufc/mL de saliva) de *Streptococcus* do grupo *mutans* em saliva de 79 crianças, na faixa etária de 5 a 6 anos de idade e de suas mães

Pares: mães/filhos	Média ±Desvio Padrão log de UFC/mL	Coefficiente de correlação	Teste T
39 (crianças sem cárie)	M = 1,4312± 1,9383 F= 2,9722±1,6814	R=0,1520 NS	0,935 NS
40 (crianças com cárie)	M = 7,6513±3,7597 F= 5,3202±2,7198	r=0,6077**	4,717**
79 crianças com e sem cárie (total)	M=5,3414±3,8001 F=3,4003±2,9841	r=0,7015**	R=8,638**

M= mães; F= filhos; NS= não significante, p> 0,05; ** significante, p< 0,01.

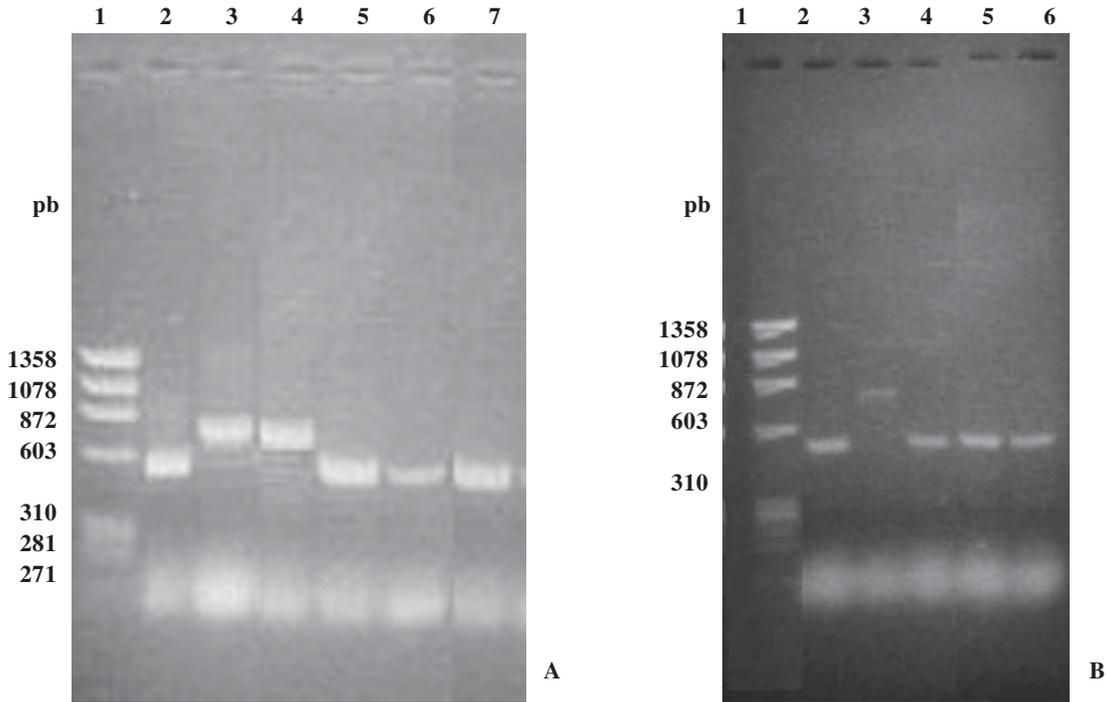


FIGURA 1 – a) Amplificação por PCR de *gtfB* e *gtfI* de seqüências de DNA cromossômico de cepas de *Streptococcus* do grupo *mutans* isoladas da placa dental usando primers GTFB-R e GTFBI-F. Linhas: 1- M marcador de peso molecular de Ø174 digerido com Hae III; 2- *S. mutans* CCT1910; 3- *S. sobrinus* ATCC 33478; 4- *S. sobrinus* de amostras de placa dental do pai da família 6; 5- *S. mutans* de amostra de placa dental da mãe da família 6; 6 e 7- *S. mutans* de amostra da placa dental do filho e irmão da família 6; **b)** amplificação por PCR de *gtfB* e *gtfI* de seqüências de DNA cromossômico de cepas de *Streptococcus* do grupo *mutans* isoladas da saliva usando primers GTFB-R e GTFBI-F. Linhas: 1- M marcador de peso molecular de Ø174 digerido com Hae III; 2- *S. mutans* CCT1910; 3- *S. sobrinus* ATCC 33478. 4- *S. mutans* de amostra de saliva do pai da família 4; 5 e 6- *S. mutans* de amostra da saliva da mãe e filho da família 4.

DISCUSSÃO

O índice CPOD dos pais das crianças sem cárie foi alto (CPOD=19,08), bem semelhante ao relatado por (TOMITA et al.²⁴, 1999), enquanto que o índice ceo das crianças com cárie foi de 2,5, e também de acordo com o observado por (LEITE et al.¹¹, 1999). Este fato possivelmente tenha ocorrido porque a cidade de Barretos possui sistema de abastecimento de água fluoretada e também porque as crianças são submetidas a programas preventivos regularmente. Um efetivo programa para prevenir ou diminuir a colonização de microrganismos do grupo *mutans* depende da identificação das fontes e do modo de transmissão entre hospedeiros infectados e não infectados. Neste estudo,

Streptococcus mutans foi detectado em 72,7% (16) amostras de biofilme e em 72,7% (16) amostras de saliva de 18 membros de seis famílias brasileiras. Estes resultados são parecidos com o trabalho de (PIMENTA et al.²⁰, 2001) realizado em Ribeirão Preto-SP, a 80 Km de Barretos, onde encontraram oitenta (73 adultos e sete crianças) de 93 pessoas, com uma freqüência de *Streptococcus mutans* de 86,0%.

Azevedo et al.² (1998) detectaram uma prevalência de 52,9% de *Streptococcus sobrinus* enquanto que neste estudo 27,8% (5 pessoas) apresentaram esta mesma espécie (quatro pais e uma filha) (Tabela 2). Fatores do biofilme auxiliam na colonização de estreptococos do grupo *mutans* promovendo um aumento do número destes microrganismos.

mos podendo induzir ao desenvolvimento da cárie (De SOET et al.⁶, 1989). Entre estes fatores incluem a síntese de polissacarídeos intra e extracelulares, produção de ácidos e habilidade para sobreviver em ambiente com pH muito ácido (De SOET et al.⁶, 1989). Experiências *in vitro* têm demonstrado que *Streptococcus sobrinus* é mais acidogênico e mais cariogênico que *Streptococcus mutans* (BALAKRISHNAN et al.³, 2000). Estas características podem influenciar na colonização de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e isto reflete a frequência de isolamento destes microrganismos do biofilme e da saliva.

Van Houte et al.²⁷ (1981) estudaram 85 crianças sem cárie e 67 crianças com cárie e seus pais. *Streptococcus mutans* foi detectado em 59% das crianças sem cárie, em 96% das crianças com cárie e em 100% de suas mães. No presente trabalho foram identificadas *Streptococcus mutans* em 100% das crianças sem cárie, porcentagem bem diferente da encontrada pelos autores anteriores e também por (PARCKER et al.¹⁹, 1999).

Okada et al.¹⁷ (2002) verificaram prevalência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* de 72,8% e 61,1%, respectivamente, onde 19 (24,7%) foram positivos para *Streptococcus mutans*, dez (13,0%) foram positivos para *Streptococcus sobrinus*, 37 (48,1%) foram positivos para ambas as espécies e 11 (14,3%) foram negativos. Não foi encontrada nenhuma amostra negativa para o grupo *mutans*. Neste trabalho a prevalência de *Streptococcus sobrinus* foi de dez (11,3%) e de *Streptococcus mutans* de 77 (87,5%), um (1,13%) foi positivo para ambas as espécies e também não foi encontrado nenhuma amostra negativa para o grupo *mutans*.

Nos resultados apresentados na Tabela 3, para as 79 crianças observou-se que o coeficiente de correlação foi de $r=0,7015$, ($p<0,01$), ou seja, existiu uma correlação positiva entre o número de estreptococos do grupo *mutans* na saliva das mães e seus respectivos filhos. Vários estudos indicaram uma correlação entre os níveis de *Streptococcus* na cavidade bucal das mães e seus filhos, e que a mãe não só constitui a principal fonte do grupo *mutans* para seu(s) filho(s), mas também que o nível desses *Streptococcus* pode implicar a extensão da colonização de suas crianças (AZEVEDO et al.², 1998). Considerando a faixa etária das crianças, neste estudo, e sabendo que tiveram oportunidade de contactarem-se com diferentes tipos de pessoas, por um longo período de tempo, não pode ser a

mãe apontada como a única e ou principal fonte dos microrganismos presentes na cavidade bucal, ressaltando que a análise qualitativa e quantitativa do grupo *mutans*, em nível de espécie, poderá servir com critério para selecionar medidas de prevenção, tornando mais viável a relação custo benefício dos tratamentos preventivos.

Packer et al.¹⁹ (1999) observaram *Streptococcus mutans* em amostras de saliva de cinquenta crianças e seus responsáveis o que concordou com os resultados do presente trabalho onde foi verificado *Streptococcus* do grupo *mutans* em todas as crianças e adultos.

Moss¹⁴ (1998) relatou que os microrganismos envolvidos no processo cariioso não são transitórios na boca, mas pertencem a microbiota bucal autóctone, a qual sobrevive por longos períodos de tempo de forma harmoniosa com o hospedeiro. Assim, a cárie pode ser explicada como resultante de alterações na homeostase de um sítio específico da boca conferindo vantagens ecológicas para a microbiota cariogênica. Portanto, vários fatores explicam porque determinados indivíduos são mais resistentes do que outros à cárie, mesmo quando a dieta é semelhante. Os estudos com famílias e com gêmeos têm mostrado a importância de fatores genéticos, o próprio dente, a saliva, o biofilme dentário bem como a virulência de cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* influenciando o estabelecimento do processo infeccioso. No caso das seis famílias estudadas, uma ou mais variáveis estão interferindo diretamente na microbiota bucal dos membros destas famílias. Isto pode explicar por que os pais com alto CPOD podem ter filhos livres de cárie.

Emilson et al.⁷ (1989) estudando a influência da saliva sobre *Streptococcus* do grupo *mutans* verificaram que a agregação de *Streptococcus mutans* com a saliva está correlacionada com uma baixa prevalência de biofilme formado *in vivo*. Isto pode explicar a ausência de cárie em crianças que têm contato diário com pais com altos índices CPODs.

A especificidade da PCR em relação ao método de fenotipagem para amostras de placa dental que continham *Streptococcus mutans* foi de 66,6% e a sensibilidade de 100,0%, e para amostras de saliva a sensibilidade foi de 95,0% e a especificidade de 50,0%. A especificidade para detecção de *Streptococcus sobrinus* para amostras de saliva foi de 95,0% e de placa dental de 100,0%, enquanto que a sensibilidade para amostras de saliva foi 100,0% e de placa dental foi 50,0% (Tabela 3).

O PCR possui limites de detecção excelentes na maior parte das situações, mas apenas uma quantidade diminuta da amostra é empregada no processo típico de amplificação. Assim, a alíquota utilizada pode não conter o microrganismo alvo se esse estiver presente em baixas proporções (CORTELLI et al. ⁴, 2003). Por este motivo muitos autores submetem o produto amplificado a um novo ciclo de amplificação aumentando a chance de detecção do microrganismo em estudo (ZAMBON & HARASZTHY²⁹, 1995).

Baseado nos valores dos resultados da sensibilidade e especificidade acima, pode-se afirmar que as duas técnicas têm idênticas eficiências na detecção dos *Streptococcus* do grupo *mutans*.

Existiu correlação positiva entre o número de *Streptococcus* do grupo *mutans* na saliva das mães e seus respectivos filhos ($r=0,7015$, $p<0,01$), sugerindo que uma redução do número de *Streptococcus* do grupo *mutans* na saliva das mães pode retardar a colonização das crianças por estas bactérias por um longo período, podendo resultar na diminuição da incidência de cárie.

Em saúde pública é importante identificar o agente causador da doença, a ecologia do biofilme e a rota de sua transmissão. O método do PCR (PCR-multiplex) mostrou, com este trabalho, ser mais uma ferramenta na identificação do estreptococos do grupo *mutans*.

ABSTRACT

Streptococcus species was isolated, identified and counted in 79 saliva and dental plaques of six families in the city of Barretos. These species are related to human carie, a worldwide public health issue. Samples of family members dental plaque and saliva were spread in SB20 (sucrose bacitracin) culture. Petri dishes were incubated in microaerofilia at 37°C for 3 days. Samples of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* were identified by means of blood agar colony characteristics, Gram-stained smear, and biochemical tests. Polymerase chain reaction (PCR) was accomplished with primers for glucosyltransferase gene magnification. All families (22 people) presented the mutans group in saliva and dental plaque. *Streptococcus mutans* was detected (PCR method) in dental plaque of 20 (90.9%) members and was not found in 2 (9.0%) people. *Streptococcus sobrinus* was found (PCR method) in saliva of 3 (13.6%) members and in dental plaque of 2 (9.0%) people. In conclusion, the PCR method (PCR multiplex) might be a tool for identification of estreptococos mutans group. It might also be useful in studying such microorganism intrafamilial transmission. PCR specificity as to cultivation method for *Streptococcus mutans* samples of dental plaque was 66.67% and sensibility was 100%. For saliva samples, sensibility was 95% and specificity was 50%. *Streptococcus sobrinus* detection specificity in saliva was 95% and in dental plaque was 100%. Sensibility for saliva samples was 100% and for dental plaque samples, it was 50%. Also, it has been observed a positive correlation between number of *Streptococcus mutans* in mother saliva and children ($r=0.7015$, $p<0.01$).

UNITERMS

Streptococcus mutans, *streptococcus sobrinus*; polymerase chain reaction, dental plaque, saliva

REFERÊNCIAS

1. Azevedo RVP. Emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo *mutans*". São Paulo; 1988. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
2. Azevedo RVP, Nelson Filho P, Assed S, Ito IY. Estreptococos do grupo *mutans*, isolamento, identificação e prevalência das espécies na saliva de pares mães/filhos. Rev Odontol Univ São Paulo 1998 jan./mar.; 12:47-50.
3. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. Austr Dent J 2000 Aug.; 45(4): 235-45.
4. Cortelli SC, Jorge AOC, Querido SMR, Cortelli JR. PCR e cultura na detecção subgingival de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: estudo comparativo. Cienc Odontol Bras 2003 abr.; 6(2): 58-64.
5. Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. Arch Oral Biol 1984 Dec.; 29:453-60.
6. De Soet JJ, TOORS FA, De GRAAFF J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. Caries Res 1989 Jan.; 23:14-7.
7. Emilson CG, Ciardi JE, Olsson J, Bowen WH. The influence of saliva on infection of the human mouth by mutans streptococci. Arch Oral Biol 1989 Mar.; 34: 335-40.

8. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980 June; 44: 331-84.
9. Igarashi T, Ichikawa K, Yamamoto A, Goto N. Identification of *mutans* streptococcal species by the PCR products of the dex genes. J Microbiol Methods 2001 Feb.; 46: 99-105.
10. Kulkarni GV, Chan KH, Sandham HJ. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of *mutans Streptococci*. J Dent Res 1989 Mar.; 68(7):1155-61.
11. Leite TA, Paula, MS, Ribeiro RA, Leite ICG. Cárie dental e consumo de açúcar em crianças assistidas por creches públicas. Rev Odontol Univ São Paulo 1999 jan./mar.; 13:13-8.
12. Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Dent Res 1995 May; 74: 681-5.
13. Li Y, Caufield PW, Redmo EI, Thornqvist E. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. Oral Microbiol Immunol 2001 May; 16: 16-23.
14. Moss SJ. Nature or nurture: diet, dental caries and oral immunology. Rev Odontol Bras Central 1998 Set.; 7:12-5.
15. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype K, in the human oral cavity. J Clin Microbiol 2004 Jan.; 42(1):198-202.
16. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by Polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000 July; 15:258-62.
17. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol 2002 Dec.; 51: 443-7.
18. Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F, Fukui K. Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of *spaP* gene. J Med Microbiol 1994 Apr.; 41:231-5.
19. Packer B, Valent PHM, Bretz WA. Avaliação de fatores relacionados à transmissão de infecções pelos estreptococos do grupo *mutans*. Rev Assoc Bras Odontol Nac 1999 jan.; 7(10): 108-13.
20. Pimenta FC, Marin JM, Uzeda M, Ito IY. Prevalence of *mutans* streptococci in 93 members from six Brazilian families. Pesqui Odontol Bras 2001 Jul.; 15(3):181-6, 2001.
21. Qureshi JY, Goldner M, Riche WH, Hargreaves JA. *Streptococcus mutans* Serotypes in young school children. Caries Res 1977 May; 3: 141-52.
22. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of five varieties of *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1974 Oct.; 19(11):1079-81.
23. Thorner RM, Remein Q. Principles and procedures in the evaluation of screening for disease. Washington, United States government: Printing office. 1961, 24 p. (Public Health Monograph, 67).
24. Tomita NE, Cordeiro R, Mendonça J., Senger V, Lopes ES. Saúde bucal dos trabalhadores de uma indústria alimentícia do centro-oeste paulista. Rev Faculd Odontol Bauru 1999 Aug.; 7: 67-71.
25. Truong TL, Ménard C, Mouton C, Trahan L. Identification of *mutans* and other oral *Streptococci* by random amplified polymorphic DNA analysis. J Med Microbiol 2000 July; 49: 63-71.
26. Whitley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998 Mar.; 13:195-216.
27. Van Houte J, Yanover L, Brecher S. Relationship of levels of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. Arch Oral Biol 1981 Aug.; 26(1): 38-46.
28. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. J Clin Microbiol 2003 Sept; 41(9): 4438-41.
29. Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. Periodontology 2000 1995 Mar.; 7:69-82.

Recebido em: 15/03/04

Aprovado em: 27/05/04

Patrícia Amoroso
Av. Eng. Necker Carvalho de Camargos, 1733
Cep: 14783-085 – Barretos-SP
sueli_amoroso@uol.com.br