

# PREVALÊNCIA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS EM SALIVA DE ESCOLARES, DE 5 A 14 ANOS DE IDADE, DA CIDADE DE SERTÃOZINHO, ESTADO DE SÃO PAULO

PREVALENCE OF MUTANS STREPTOCOCCI IN THE SALIVA OF 5-14 YEAR-OLD SCHOOL-CHILDREN IN SERTÃOZINHO CITY, SÃO PAULO, BRAZIL

Paulo NELSON FILHO

Odontopediatra do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP.

Mariângela BAPTISTUSSI

Cirurgiã-Dentista

Rosa Vitoria Palamin AZEVEDO

Professora Doutora do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Maria Cristina Monteiro de SOUZA-GUGELMIN

Professora Assistente do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Izabel Yoko ITO

Professora Titular do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

**A** análise bacteriológica de 104 amostras de saliva de crianças, de ambos os sexos, com idade de 5 a 14 anos, da Escola Crescência Carolo Balbo - Usina São Francisco - Sertãozinho, SP, demonstrou que todas (100,0%) albergavam os estreptococos do grupo mutans. Na contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do grupo mutans pelo método da diluição decimal, obteve-se a média de  $1,4 \times 10^6$  (6,15 log) UFC/mL, com variação de  $2,0 \times 10^2$  a  $3,04 \times 10^7$ , sendo  $1,57 \times 10^6$  (6,19 log) para a espécie *S.mutans* e  $0,04 \times 10^6$  para *S.rattus*, quando detectados como biotipo único, e  $1,42 \times 10^6$  (6,15 log) para a associação *S.mutans/S.sobrinus*. Das 132 cepas isoladas, submetidas a biotipagem, a maioria foi identificada como da espécie *S.mutans* (72,0%), seguida das espécies *S.sobrinus* (15,9%) e *S.rattus* (9,8%) com maior frequência e, por *S.cricetus* e *S.mutans* (V) com 1,5 e 0,8%, respectivamente. Quanto à prevalência, notou-se a predominância da colonização pela espécie única *S.mutans* em 71 (68,2%) crianças, seguida da associação *S.mutans/S.sobrinus* em 16 (15,4%).

**Unitermos:** Estreptococos mutans, prevalência; Saliva.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, é inquestionável a implicação dos estreptococos do grupo mutans como os primordiais agentes associados com o início e o desenvolvimento da lesão cáriosa em humanos (EMILSON; KRASSE<sup>10</sup>, 1985; BEIGHTON; RIPPON; THOMAS<sup>3</sup>, 1987), embora se reconheça não serem estes os únicos microrganismos envolvidos no processo (LOESCHE, 1986).

Vários estudos têm relatado que os níveis de estreptococos do grupo mutans, em amostras de saliva, se correlacionam com o risco de cárie em crianças, adolescentes e adultos (ALALUUSUA; GRÖNROSS; KLEEMOLA-KUJALA<sup>1</sup>, 1989; CANTISANO<sup>7</sup>, 1981; KÖHLER; ANDRÉEN; JONSSON<sup>15</sup>, 1988), sendo que um número maior que  $10^6$  por mililitro indica alto risco de cárie (KLOCK; KRASSE, 1979) e, também, uma correlação significativa com a atividade de cárie (KLOCK; KRASSE<sup>14</sup>, 1979; ZICKERT; EMILSON; KRASSE<sup>22</sup>, 1982; BUISCHI et al.<sup>6</sup>, 1989).

BEIGHTON; RIPPON; THOMAS<sup>3</sup> (1991) ressaltam que, embora o grupo mutans seja constituído de 7 diferentes espécies, as espécies predominantemente isoladas da saliva e placa dental e, também, mais envolvidas na iniciação e progressão da cárie em humanos, são os *S.mutans* e *S.sobrinus*.

LINDQUIST; EMILSON<sup>16</sup> (1991) relataram a importância da discriminação do grupo mutans a nível de espécie, quando da verificação da prevalência de microrganismos cariogênicos em humanos.

O objetivo deste trabalho é efetuar a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de estreptococos do grupo mutans em saliva de crianças da cidade de Sertãozinho-SP e avaliar a prevalência das espécies isoladas.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas amostras de saliva de 104 crianças, de ambos os sexos, da Escola Crescência Carolo Balbo-Usina São Francisco da cidade de Sertãozinho-SP, compreendendo a faixa etária de 5 a 14 anos de idade.

Aproximadamente 2,0mL de saliva não estimulada foram coletados em tubos esterilizados contendo pérolas de vidro e transportados em gelo. As amostras de saliva foram submetidas à diluição decimal até  $10^{-4}$ , em solução salina tamponada (PBS) esterilizada.

Aliquotas de 0,05mL foram depositadas no centro de placas de Petri contendo o ágar SB20 modificado

(AZEVEDO<sup>2</sup>, 1988), seguida de distribuição uniforme com auxílio de bastão de vidro angulado, esterilizado, e incubadas a 37°C em microaerofilia, pelo método da chama de vela, durante 3 dias.

Após a incubação, efetuou-se a contagem do número de UFC, considerando-se as diluições em que cresceram no máximo 300 UFC, com o auxílio de microscópio estereoscópico.

Em seguida, pelo menos 3 colônias com tipos morfológicos característicos foram transferidas para tubos contendo tioglicolato ("Fluid thioglycolate medium w/o glicose or indicator"-Merck), incubados a 37°C por 24 horas, a partir do qual foram efetuadas as provas bioquímicas, segundo o esquema de SHKLAIR; KEENE<sup>20</sup> (1974).

## RESULTADOS

Os estreptococos do grupo mutans foram detectados em todas as 104 amostras de saliva dos escolares, com uma contagem média de  $1,4 \times 10^6$  (6,15 log) UFC/mL, com variação de  $2,0 \times 10^2$  a  $3,04 \times 10^7$ . Estas amostras permitiram o isolamento de 132 cepas do grupo mutans, sendo a maioria (72,0%) identificada como da espécie *S.mutans*, seguida das espécies *S.sobrinus* (15,9%) e *S.rattus* (9,8%) com maior frequência e, por *S.cricetus* e *S.mutans* (V) com 1,5% e 0,8%, respectivamente (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra que 77 indivíduos (74,0%) albergavam uma única espécie, sendo 68,2% com *S.mutans*, 3,8% com *S.rattus* e apenas 1,0% com *S.sobrinus* ou *S.cricetus*. Pode-se constatar que 27 (26,0%) eram multicolonizados, com predomínio de combinações entre as espécies *S.mutans/S.sobrinus* (15,4%) e *S.mutans/*

TABELA 1- Número e Frequência de espécies de streptococos do grupo mutans isoladas das amostras de saliva de 104 crianças

ESPÉCIE	NÚMERO	PORCENTAGEM
<i>S.mutans</i>	95	72,0
<i>S.sobrinus</i>	21	15,9
<i>S.rattus</i>	13	9,8
<i>S.cricetus</i>	2	1,5
<i>S.mutans</i> (V)	1	0,8

TABELA 2- Prevalência de portadores de espécies do grupo mutans e média de UFC/ML de saliva.

ESPÉCIE (S)	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	PORCENTAGEM	MÉDIA DE UFC (X10 <sup>6</sup> )
<i>S.mutans</i>	71	68,2	1,57
<i>S.rattus</i>	4	3,8	0,04
<i>S.sobrinus</i>	1	1,0	0,06
<i>S.cricetus</i>	1	1,0	0,10
<i>S.mutans</i> + <i>S.sobrinus</i>	16	15,4	1,42
<i>S.mutans</i> + <i>S.rattus</i>	6	5,7	0,55
<i>S.sobrinus</i> + <i>S.rattus</i>	3	2,9	0,04
<i>S.mutans</i> + <i>S.cricetus</i>	1	1,0	0,05
<i>S.mutans</i> + <i>S.sobrinus</i> + <i>S.mutans</i> (V)	1	1,0	0,12
TOTAL	104	100,0	1,40

*S.rattus* (5,7%).

Quanto aos portadores, a espécie predominante, *S.mutans*, foi detectada em cultura pura de 71 escolares (68,2%) e, em associação *S.mutans/S.sobrinus* de 16 indivíduos (15,4%), *S.mutans/S.rattus* em 6 (5,7%); sendo que as combinações *S.mutans/S.cricetus* e *S.mutans/S.sobrinus/S.mutans* (V) foram isoladas cada qual de uma criança (1,0%). Quanto às demais espécies, detectadas como espécie única, foram *S.rattus* de 4 indivíduos (3,8%) e *S.sobrinus* ou *S.cricetus* de apenas 1 (1,0%). As espécies *S.sobrinus* e *S.rattus*, em conjunto, foram isoladas de 3 escolares (2,9%).

## DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos indicam que o número de estreptococos do grupo mutans na saliva ou placa dental correlaciona-se positivamente com a cárie dental no homem, tanto em populações com alta (BUISCHI et al.<sup>6</sup>, 1989) como com baixa prevalência de cárie (CARLSSON et al.<sup>8</sup>, 1987).

O número de UFC do grupo mutans na saliva das 104 crianças apresentou um valor médio de  $1,4 \times 10^6$  (6,15 log) UFC/mL, que está em concordância com o obtido por ZICKERT et al.<sup>22</sup> (1982) e HOLBROOK;

BEIGHTON<sup>13</sup> (1986), porém, superior aos de KÖHLER; ANDRÉEN; JONSSON<sup>15</sup> (1988); FUJIWARA et al.<sup>12</sup> (1991); LINDQUIST; EMILSON<sup>16</sup> (1991).

Segundo LINDQUIST; EMILSON<sup>16</sup> (1991) é importante efetuar a identificação dos membros do grupo mutans a nível de espécie, quando da análise de prevalência em humanos. Assim, efetuando-se a identificação das espécies por meio de provas bioquímicas, segundo SHKLAIR; KEENE<sup>20</sup> (1974), notou-se a predominância da espécie *S.mutans* (72,0%), seguida de *S.sobrinus* (15,9%), *S.rattus* (9,8%) e *S.cricetus* (1,5%).

Quanto à prevalência, a espécie *S.mutans* obtida em 95 (91,3%) crianças, isolada como espécie única em 71 (68,2%), nossos resultados concordam com os de EMILSON<sup>9</sup> (1983), CARLSSON et al.<sup>8</sup> (1987), KÖHLER; ANDRÉEN; JONSSON<sup>15</sup> (1988) e FUJIWARA et al.<sup>12</sup> (1991) e autores nacionais tais como FRACALANZZA<sup>11</sup> (1979), CANTISANO<sup>7</sup> (1981), MIRANDA; VERTUAN; PIZSOLITTO<sup>19</sup> (1982) e TORRES<sup>21</sup> (1990), indicando que o *S.mutans* (biotipo I) é a espécie prevalente no Brasil.

No que diz respeito à frequência de isolamento da espécie *S.sobrinus*, como espécie única em 1 (1%) ou em associação em 21 (20,2%) indivíduos, nossos dados correspondem aos obtidos por SHKLAIR; KEENE<sup>20</sup>

(1974), FRACALANZZA<sup>11</sup> (1979), CANTISANO<sup>7</sup> (1981), MIRANDA; VERTUAN; PIZSOLITTO<sup>13</sup> (1982), HOLBROOK; BEIGHTON<sup>13</sup> (1986), BEIGHTON; RIPPON; THOMAS<sup>3</sup> (1987), CARLSSON et al.<sup>8</sup> (1987), KÖHLER; ANDRÉEN; JONSSON<sup>15</sup> (1988), TORRES (1990) e FUJIWARA et al.<sup>12</sup> (1991), que utilizaram saliva para o isolamento. No entanto, são discrepantes em relação aos resultados de AZEVEDO<sup>2</sup> (1988) que o isolou somente como biotipo múltiplo em 7,4% das amostras, sendo 2,87% para a associação *S.mutans/S.sobrinus*.

Ainda em relação à colonização múltipla, de acordo com KÖHLER et al. (1988) e FUJIWARA et al.<sup>12</sup> (1991), os portadores da associação *S.mutans/S.sobrinus* apresentam níveis mais elevados do grupo mutans na saliva do que aqueles que abrigam apenas a espécie *S.mutans*. Quanto a isso, os nossos resultados,  $1,57 \times 10^6$  (6,19log) UFC/mL para *S.mutans* e  $1,42 \times 10^6$  (6,15log) para *S.mutans/S.sobrinus*, foram equivalentes.

Em relação às demais combinações entre espécies isoladas (Tabela 2), principalmente as correspondentes àquelas entre *S.mutans/S.rattus* (5,7%), *S.sobrinus/S.rattus* (2,9%), não é possível comparar estes resultados com os de outros pesquisadores, exceto AZEVEDO<sup>2</sup> (1988), por não as terem isolado ou por as terem obtido com baixa frequência.

Quanto à espécie *S.rattus*, como biotipo único (3,8%), no Brasil, foi identificada por BRATTHALL<sup>5</sup> (1972), empregando a imunofluorescência, em 20,0% das amostras de placa dental de indivíduos do Rio de Janeiro-RJ e, por cultura, em 5,7% das amostras de placa dental obtidas de escolares da cidade de Piracicaba-SP (MARTINS; BERTOLINI<sup>18</sup>, 1980) e, em 20,15% das amostras de placa dental colhidas de adultos e crianças de Ribeirão Preto-SP (AZEVEDO<sup>2</sup>, 1988).

A frequência de isolamento do *S.cricetus*, isoladamente ou em conjunto com *S.mutans* (1,0%), não corresponde aos resultados de AZEVEDO<sup>2</sup> (1988) para biotipo múltiplo (43,5%), nem para espécie única (1,8%), e TORRES<sup>21</sup> (1990), que obteve 3,5% como biotipo múltiplo, em saliva de adolescentes de Araraquara-SP.

No que diz respeito a estas diversidades na frequência de isolamento de diferentes espécies do grupo mutans, devem ser lembrados os estudos de BRATTHALL<sup>5</sup> (1972); SHKLAIK; KEENE<sup>20</sup> (1974) e, entre nós, FRACALANZZA<sup>11</sup> (1979) e TORRES<sup>21</sup> (1990) que se referem à possível interferência de variações geográficas e, principalmente, da metodologia adotada, tal como o tipo de amostra e o meio seletivo empregados no isolamento de determinadas espécies.

## ABSTRACT

After bacteriologic analyses of 104 saliva strains of 5 to 14 years-old schoolchildren in the Crescência Carolo Balbo School - Sertãozinho City - State of São Paulo-Brazil, we observed that all the strains (100.0%) had the mutans streptococci group. After counting the CFUs (Colonies Forming Unities) of mutans streptococci by the decimal dilution method we obtained the  $1.4 \times 10^6$  (6.15 log) CFU/mL mean by the variation of  $2.0 \times 10^2$  to  $3.04 \times 10^7$ . When the species were detected by the only biotype, we had  $1.57 \times 10^6$  (6.19log) for *S.mutans* and  $0.04 \times 10^6$  for *S.rattus* species. When *S.mutans/S.sobrinus* species were associated each other, we had  $1.42 \times 10^6$  (6.15 log). In 132 strains isolated and submitted to the biotyping, the majority of that were identified: *S.mutans* (72.0%), *S.sobrinus* (15.9%) and *S.rattus* (9.8%) species and *S.cricetus* and *S.mutans* (V) species with 1.5 and 0.8% respectively. About the prevalence, we noted the predominant colonies by the *S.mutans* - only specie - in 71 (68.2%) children, and *S.mutans/S.sobrinus* associated species in 16 (15.4%) children.

UNITERMS: Mutans streptococci, prevalence; Saliva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALALUUSUA, S.; GRÖNROOS, L.; KLEEMOLA-KUJALA, E. *Streptococcus mutans*, not detected? *Oral Microbiol. Immunol.*, v.4, n.3, p.176-7, 1989.
- 2- AZEVEDO, R.V.P. - O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans", São Paulo, 1988. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 3- BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5-8 year-old Hampshire schoolchildren. *Brit.dent. J.*, v.162, n.3, p.103-6, 1987.
- 4- BEIGHTON, D.; RUSSEL R.R.B.; WHILEY, R.A. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res.*, v.25, n.3, p.174-8, 1991.
- 5- BRATTHALL, D. Immunofluorescent identification of *Streptococcus mutans*. *Odont. Revy.*, v.23, n.2, p.181-96, 1972.
- 6- BUISCHI, Y.A.P. et al. Salivary *Streptococcus mutans* and caries prevalence in Brazilian schoolchildren. *Community Dent.oral Epidem.*, v.17, n.1, p.28-30, 1989.

- 7- CANTISANO, M.H. **Determinação do número de Streptococcus mutans na saliva de crianças com 6 anos de idade e diferentes experiências de cárie**. Bauru, 1981. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 8- CARLSSON, P. et al. High prevalence of mutans streptococci in a population with extremely low prevalence of dental caries. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.2, n.3, p.121-4, 1987.
- 9- EMILSON, C.G. Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. **Scand.J.dent.Res.**, v.91, n.1, p.26-32, 1983.
- 10- EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. **Scand.J.dent.Res.**, v.93, n.2, p.96-104, 1985.
- 11- FRACALANZZA, S.E.L. **Isolamento e caracterização de Streptococcus mutans e seus biotipos de placa dental de crianças da cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1979. Tese (Doutorado) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 12- FUJIWARA, T. et al. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent.oral Epidem.** v.19, n.3, p.151-4, 1991.
- 13- HOLBROOK, W.P.; BEIGHTON, D. *Streptococcus mutans* levels in saliva and distribution of serotypes among 9-year-old Icelandic children. **Scand.J.dent.Res.**, v.95, n.1, p.37-42, 1986.
- 14- KLOCK, B.; KRASSE, B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. **Scand.J.dent.Res.**, v.87, n.2, p.129-39, 1979.
- 15- KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.3, n.1, p.14-17, 1988.
- 16- LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. **Caries Res.**, v.25, n.2, p.146-52, 1991.
- 17- LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev.**, v.50, n.4, p.353-80, 1986.
- 18- MARTINS, A.B.; BERTOLINI, P. Incidência das espécies de *Streptococcus mutans* em crianças da região de Piracicaba, segundo o esquema de Shklair, Keene (1974). **Rev. paul. Odont.**, v.2, n.2, p.42-5, 1980.
- 19- MIRANDA, V.C.; VERTUAN, V.; PIZSOLITTO, A.C. *Streptococcus mutans* na saliva: sua relação com o índice de cáries. **Rev. gaúcha Odont.**, v.30, n.3, p.183-5, 1982.
- 20- SHKLAIR, I.L.; KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of five varieties of *Streptococcus mutans*. **Arch.oral Biol.**, v.19, n.11, p.1079-81, 1974.
- 21- TORRES, S.A. **Avaliação do ágar SB20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes**. Araraquara, 1990. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- 22- ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. **Arch.oral Biol.**, v.27, n.10, p.861-8, 1982.