

Identificação e Caracterização de Microrganismos Isolados de Cárie Dental Humana

Identification and Characterization of Isolated Microorganism of Human Dental Caries

Alexandre Carvalho de Moura^{a*}; Fabiana Gisele da Silva Pinto^b; Alisson Eduardo Marassi^c

Resumo

No presente estudo foi avaliado a resistência de microrganismos testados em diferentes antimicrobianos. Foram analisadas amostras isoladas de cáries, mucosas bucais, face vestibular e lingual de indivíduos na cidade de Cascavel, Paraná. As amostras foram semeadas segundo os procedimentos convencionais. Após isolamento primário o modelo de resistência foi determinado através da concentração inibitória mínima (CIM), determinando a suscetibilidade frente ao painel Gram-positivo (automação MicroScan). Das 40 amostras foram identificados cepas de *Streptococcus bovis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Apresentaram padrão de sensibilidade, com exceção de algumas cepas de *Enterococcus faecalis* que apresentaram resistência quando testados à Clindamicina e Synercid. Notou-se diversidade microbiana e concluiu-se que as amostras apresentaram um baixo grau de resistência aos antimicrobianos testados.

Palavras-chaves: Streptococcus. Cárie-dental. Resistência a antimicrobianos.

Abstract

In the following research, the resistance of microorganisms tested along with different antimicrobials has been evaluated. It's been tested samples isolated from caries, mouth mucous, vestibular face and tongue of individuals in the city of Cascavel, Paraná. The samples have been disseminated according to conventional procedures. After primary isolation, the model resistance was determined through minimum inhibitory concentration (CIM), determining the susceptibility facing the Gram-positive panel (MicroSan automation). From the 40 samples strains of Streptococcus bovis, S. mitis, S. salivarius, S. pneumoniae and Enterococcus faecalis were identified. The strains showed a sensibility pattern with the exception of some Enterococcus faecalis strains which showed resistance when tested with Clindamicina and Synercid. The results revealed a diversity of microorganisms which led to the conclusion that the samples presented low level of resistance to the antimicrobials tested.

Keywords: Streptococcus. Dental caries. Resistance to antimicrobials

^a Mestre em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina (UEL).
Docente da Faculdade Assis Gurgacz. E-mail: acmoura@fag.edu.br

^b Doutora em Microbiologia - Universidade Estadual de Londrina (UEL).
Docente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).
E-mail: fabianagsp@yahoo.com.br

^c Farmacêutico Bioquímico, Especialista. E-mail: elacionamento_1@alvaro.com.br

* Endereço para correspondência: Rua Santa Helena 30, CEP. 85.818-760, Cascavel - PR.

1 Introdução

A cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível, em seu estágio inicial de desmineração do esmalte dental^{1,2}. A capacidade infectiva dos microrganismos é multifatorial, estando presente diversos fatores como a susceptibilidade do hospedeiro, a dieta contendo carboidratos e a microbiota contendo microrganismos acidogênicos^{3,4}.

A cavidade oral é uma região do corpo humano que apresenta grande diversidade de microrganismos, especialmente bacterianos, dentre os quais são observados os gêneros *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* e *Actinomyces* que representam mais de 80% de toda microbiota cultivável e vivem em delicado equilíbrio homeostático⁵.

Muitos microrganismos, principalmente bactérias do

gênero *Streptococcus*, devido a um desequilíbrio no ambiente bucal, podem se expressar de forma oportunista e vir a causar infecções como a cárie dental⁶. Em algumas situações, as infecções podem se tornar patogenicamente perigosas causando moléstias graves, como osteomielites, e até mesmo, atingir a corrente circulatória causando seps⁷. Os estudos microbiológicos de cáries dentais mostram considerável diversidade microbiana associada a microflora bucal por processos que ainda não estão muito bem elucidados⁸.

O controle da placa bacteriana na cavidade oral é um dos pontos principais na prática odontológica e o uso de substâncias químicas para redução e eliminação da mesma não deve substituir o controle mecânico pelo paciente e pelo profissional⁹.

A resistência de microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos a diferentes antimicrobianos vem sofrendo expansão significativa. As bactérias Gram positivas, devido sua alta frequência de resistência, têm contribuindo para o aumento dos números totais de resistências aos antimicrobianos comercializados, tornando-se grave problema nas últimas décadas¹⁰.

Os antimicrobianos, tais como, Penicilina, Tetracilina e Linezolid entre outros que estão disponíveis e de fácil acesso no mercado, são utilizados no controle da manutenção

da higiene e saúde bucal, muitas vezes de forma incorreta e indiscriminada, podendo inclusive, selecionar cepas resistentes, gerando aumento nos casos de doenças por microrganismos multirresistentes.

Devido ao fato da cárie dental ser considerada problema constante de saúde pública e crescente na população, além da grande diversidade de microrganismos relacionados a cavidade oral, bem como a notificação de resistência de diversos patógenos frente a diferentes antimicrobianos, torna-se necessário o presente estudo, objetivando identificar a diversidade microbiana presente em cárie dental humana e avaliar o perfil de resistência em relação a diferentes antimicrobianos utilizados em consultórios odontológicos.

2 Material e Método

Foram selecionados 40 pacientes saudáveis, sem comprometimento imunológico, comprovado por testes sanguíneos, cario - ativos, de forma aleatória, entre idades de 9 a 60 anos, de ambos os sexos, sem distinção de raças ou classes sociais, os quais aceitaram participar do projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A coleta foi realizada em determinado consultório odontológico, na cidade de Cascavel, região oeste do Paraná, por um profissional odontólogo de conduta conhecida pelo participante o qual já estava em tratamento. Somente após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade Assis Gurgacz, protocolo 446/2007, deu-se início a pesquisa.

Para obtenção dessas amostras utilizou-se de curetas e Swabs estéreis, com os quais foram realizadas raspagens da placa dental das faces vestibular e lingual, mucosa e dorso da língua desses indivíduos.

As amostras foram imediatamente acondicionadas em tubos de ensaio com solução salina a 0,9% e levadas ao laboratório de microbiologia da Faculdade Assis Gurgacz em banho de gelo, em período máximo de duas horas. Em seguida, procederam-se diluições seriadas em salina estéril e crescimento dos microrganismos em microaerofilia a 37° C por 24 horas em placas contendo Agar BHI para seu posterior isolamento e identificação.

Após isolamento primário, as amostras foram submetidas à identificação e determinação da suscetibilidade frente ao painel Gram-positivo (automação MicroScan), ocorrendo a leitura dos resultados após 18-24 horas de incubação a 35°C ± 1°C. 40 amostras foram concomitantemente identificadas através de provas bioquímicas convencionais.

Com base nessas amostras, também foi efetuado o teste de suscetibilidade, empregando-se a metodologia da difusão do disco em ágar frente à: Amoxicilina/ Ac. Clavulâmico, Ampicilina, Cefazolina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gatifloxacina, Gentamicina, Levofloxacina, Linezolid, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Oxacilina, Penicilina, Rifampicina, Tetracilina, Sulfametaxazol Trimetoprim,

Vancomicina, Eritromicina, Gent. Synergy, Estreptomicina.

Utilizaram-se amostras de *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213 como controle dos resultados obtidos, seguindo os critérios estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

A leitura e análise dos dados ocorreram através da observação e metria dos halos de inibição para determinação do perfil de sensibilidade, sendo comparados com a tabela do fabricante.

3 Resultados e Discussão

Dos 40 pacientes selecionados para o estudo, 40 amostras de microrganismos foram isoladas e identificadas como sendo de *Streptococcus bovis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM), obtidos pela utilização de diversos antimicrobianos testados em microrganismos bucais, podem ser visualizados na tabela 1.

Os resultados para os testes de concentração inibitória mínima (CIM) nos 40 isolados das mucosas bucais, faces vestibular e lingual dos dentes, demonstram que somente as cepas de *Enterococcus faecalis* apresentaram resistência frente à Clindamicina e Sinercid, mostrando-se sensíveis às outras. Quanto às cepas de *Streptococcus bovis* e *S. pneumoniae* foi possível observar sensibilidade a todas as drogas testadas, conforme observado na tabela 1.

A resistência de microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos vem sofrendo expansão significativa¹⁰. Os cocos gram-positivos são importantes agentes de infecção, e a resistência destes patógenos a antimicrobianos tem aumentado como evidenciado por autores¹¹. Ao contrário do que descreve a literatura, as cepas analisadas demonstraram-se sensíveis ou intermediárias em quase todos os antibióticos testados.

Drogas como a tetraciclina, estão dentre as mais eficazes no controle microbiano, sendo o segundo grupo de drogas mais utilizadas no mundo e possuindo amplo espectro de ação sobre microrganismos bucais, tanto Gram-negativos quanto Gram-positivos¹², nesse estudo confirmaram a sua atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento bacteriano de todas as cepas testadas.

O padrão de sensibilidade frente a cepas de *E. faecalis* mostrou resultados intermediários à Cefazolina, Ceftriaxona, Gentamicina, Oxacilina e Eritromicina, as cepas de *S. bovis* apresentaram-se intermediárias à Norfloxacina e Vancomicina, assim como os *Streptococcus. mitis* apresentou-se à Ciprofloxacina, Gentamicina, Norfloxacina, Vancomicina, e *S. salivarius* à Vancomicina. As concentrações inibitórias intermediárias, frente a antimicrobianos como vancomicina é uma preocupação constante, por se tratar deste, como um dos últimos recursos da terapêutica de bactérias gram positivas.

Entre os *E. faecalis*, as cepas apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos, com exceção de Clindamicina e Synercid com elevada resistência observada. Em relação ao

Tabela 1: Padrão de resistência aos antimicrobianos testados

	<i>S. bovis</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. salivarius</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. pneumoniae</i>	
	CIM	Padrão	CIM	Padrão	CIM	Padrão	CIM	Padrão	CIM	Padrão
Amox/k Clav	<=4/2	S	<=4/2	S	<=4/2	S	<=4/2	S	<=4/2	S
Amp/Sulbactam	<=8/4	S	<=8/4	S	<=8/4	S	<=8/4	S	<=8/4	S
Ampicilina	<=0.25	S	0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=0.25	S
Cefazolina	<=2	S	16	I	<=2	S	<=2	S	<=2	S
Ceftriaxona	<=4	N/R	16	I	<=4	S	<=4	S	<=4	S
Ciprofloxacina	<=1	S	<=1	S	<=1	S	2	I	<=1	S
Clindamicina	<=0.25	S	>2	R	<=0.25	S	<=0.25	S	<=0.25	S
Gatifloxacina	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S
Gentamicina	4	S	8	I	<=1	S	8	I	<=1	S
Levofloxacina	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S	<=2	S
Linezolid	<=0.5	S	1	S	<=0.5	S	<=0.5	S	<=0.5	S
Nitrofurantoina	<=32	S	<=32	S	<=32	S	<=32	S	<=32	S
Norfloxacina	8	I	<=4	S	<=4	S	>8	I	<=4	S
Oxacilina	<=0.25	S	>2	I	<=0.25	S	<=0.25	S	<=0.25	S
Penicilina	0.12	S	2	S	<=0.03	S	<=0.03	S	<=0.03	S
Rifampicina	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	S	<=1	S
Synercid	1	S	>2	R	0.5	S	1	S	1	S
Tetracilina	<=4	S	<=4	S	<=4	S	<=4	S	<=4	S
Trimeth/Sulfa	<=2/38	S	<=2/38	S	<=2/38	S	<=2/38	S	<=2/38	S
Vancomicina	<=2	I	<=2	S	<=2	I	<=2	I	<=2	S
Eritromicina			1	I	<=0.5	S	<=0.5	S	<=0.5	S
Gent. Synergy			<=500	S	<=500	S	<=500	S	<=500	S
Estreptomicina			<=1000	S	<=1000	S	<=1000	S	<=1000	S

Legenda: S=Sensível; I= Intermediário; R= Resistente, N/R= Não reportado.

Valores precedidos do símbolo maior que (“>”) encontram-se fora de escala, isto é, o antimicrobiano não conseguiu inibir o crescimento bacteriano nem com a maior concentração utilizada.

Valores precedidos do símbolo menor que (“<”) encontram-se fora de escala, isto é, o antimicrobiano inibiu o crescimento bacteriano mesmo com a menor concentração utilizada.

Synercid, o resultado era esperado, pois a literatura descreve o *E. faecalis* habitualmente resistente a este antimicrobiano¹¹.

Enterococcus sp. é outro importante grupo de microrganismos que se destacam, cada vez mais, como patógenos oportunistas. Entre os *Enterococcus spp.*, há relatos de cepas resistentes à vancomicina em nosso meio, entretanto, nesse estudo, as cepas de *E. faecalis* mostraram-se sensíveis a essa droga. Nos últimos anos, os enterococos têm emergido como importantes agentes de infecção, tendo gerado sérios problemas devido ao desenvolvimento de resistência¹¹. Porém, a combinação de penicilina ou ampicilina ou vancomicina mais gentamicina ou estreptomicina são eficazes em um tratamento¹³.

As espécies identificadas do grupo viridans, *S. salivarius* e *S. mitis* também apresentaram padrão de sensibilidade às drogas testadas. Esses microrganismos são predominantes das membranas mucosas e da língua do homem¹⁴. As cepas de *S. salivarius* são detectadas com maior regularidade e considerados como a principal espécie pioneira na colonização da cavidade bucal¹⁵.

No trabalho, nota-se a baixa frequência de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*. É incomum a baixa incidência desses

microrganismos na cavidade bucal por apresentarem forte relação com o desenvolvimento patogênico da cárie humana. Essas espécies são isoladas com maior frequência da placa dental e por apresentarem alto metabolismo de carboidratos fermentáveis tornam-se os principais causadores dessa doença. Entretanto, resultados semelhantes foram encontrados diferentes autores que observaram grande diversidade de microrganismos na microbiota oral acompanhado de ausência de *Streptococcus mutans*¹⁶.

Acreditamos que esta ausência, apesar de incomum é perfeitamente aceitável, pois sabemos que diversos outros microrganismos apresentam caráter cariogênico. Sua ausência pode estar relacionada a pouca circulação destas bactérias frente à população humana estudada, uma vez que é comum distribuição irregular de patógenos na espécie humana em relação à geografia que os hospedeiros humanos se encontram.

Atualmente tem-se discutido diversas formas para o controle da microbiota bucal, visando à prevenção da cárie dental. Dentre elas a importância de manter correta higiene, o uso de agentes antimicrobianos e, principalmente, a prevenção da transmissão dos microrganismos cariogênicos, por meio de orientação e educação da saúde bucal.

A identificação dos microrganismos presentes na cárie, bem como a determinação e conhecimento de seus padrões de sensibilidade frente aos diversos antimicrobianos, torna-se fundamental para a correta prática de tratamento e controle da doença na população.

4 Conclusão

As análises demonstram grande diversidade de bactérias presente em placas bacterianas de origem dental e de cárie humana, além daquelas frequentemente relacionadas à doença como *S mutans*. Apesar da diversidade, ainda apresentam amplo perfil de sensibilidade frente a diversos antimicrobianos utilizados na clínica odontológica.

Os resultados obtidos permitem concluir que os antimicrobianos avaliados, podem reduzir significativamente o número de microrganismos que são frequentemente encontrados na cavidade bucal humana.

Referências

1. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol.* 1960;1:304-20.
2. Caufield PW. Dental caries-a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Pediatr Dent.* 1997;19(8):491-8.
3. Burt BA, Loesche WJ, Eklund SA, Earnest RW. Stability of *Streptococcus mutans* and its relationship to caries in a child population over 2 years. *Caries Res.* 1983;17(6):532-42.
4. Li Y, Wang W, Caufield PW. The fidelity of *mutans streptococci* transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res.* 2000;34(2):123-32.
5. Guimarães MCM. Uso racional de antimicrobianos na Odontologia. *Rev Saúde HUB* 2005;1.
6. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent.* 2009;2:76-87.
7. Meurman JH, Pyhönen S, Teerenhovi L, Lindqvist C. Oral sources of septicemia in patients with malignancies. *Oral Oncol.* 1997;33:389-97.
8. Martin FE. Carious pulpitis: microbiological and histopathological considerations. *Aust Endod J.* 2003 Dec;29(3):134-7.
9. Gebran MP, Tuiuti APOG. Controle químico e mecânico de placa Bacteriana. *Ciênc Cult.* 2002 Jan;26(3):45-58.
10. Gaetti-Jardim Júnior E, Gaetti-Jardim EC, Lins SÂ, Oliveira SR, Semenoff Segundo A. Susceptibilidade de bactérias anaeróbias isoladas de infecções Periimplantares e Periodontais ao Metronidazol, Lincosaminas, Macrolídeos e Tetracilina. *Rev Odonto Ciênc.* 2007 Abr/Jun;22(56):131-7.
11. Mendes C, Sinto SI, Hsiung A, Oplustil C, Teixeira L, Segura A *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro de quinupristina/dalfopristina para cocos gram-positivos isolados de cinco centros brasileiros: resultado do estudo de vigilância L-SMART. *J Bras Patol Med Lab.* 2002;38(3):191-7.
12. Lancaster H, Ready D, Mullany P, Sprat D, Bedi R, Wilson M. Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. *FEMS Microbiol.* 2003;228:99-104.
13. Levin AS. *Enterococcus resistente a resistente a vancomicina.* São Paulo: USP; 2008.
14. Almeida PF. Microbióta estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2002;1:33-41.
15. Guimarães MS, Zuanon AC, Spolidório DMP, Bernardo WLC, Campos JÁDB. Atividade de cárie na primeira infância fatalidade ou transmissibilidade? *Cienc Odontol Brás.* 2004; 7(4):45-51.
16. Hahn CL, Falkler WAJR, Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. *J Dent Res.* 1991;36(2):147-53.