

AVALIAÇÃO DO MEIO LAPTg COMO ALTERNATIVA PARA O ISOLAMENTO DE *Streptococcus* DO GRUPO *Mutans* E LACTOBACILOS DA SALIVA

EVALUATION OF MEDIUM LAPTg AS AN ALTERNATIVE FOR THE ISOLATION OF *MUTANS STREPTOCOCCI* AND LACTOBACILII FROM SALIVA

**Edson Yukio Komiyama
Antonio Olavo Cardoso Jorge
Clélia Aparecida de Paiva Martins
Ivan Balducci
Cristiane Yumi Koga-Ito**

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP

RESUMO

O importante papel etiológico dos estreptococos do grupo mutans e dos lactobacilos no processo de cárie tem sido amplamente estudado, sendo a contagem destes grupos de microrganismos freqüentemente utilizada para o diagnóstico e propósitos predictivos em cariologia. O meio de cultura LAPTg foi desenvolvido para a contagem simultânea de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos a partir de amostras de saliva com o intuito de redução de custos e diminuição do tempo de processamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar o meio de LAPTg com 7% sacarose como uma possível alternativa para os meios ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose (MSBS) e Rogosa, que são os mais utilizados para isolamento de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, respectivamente. Foram coletadas amostras de saliva de 50 alunos da graduação em Odontologia, as quais foram diluídas e semeadas nos meios LAPTg com 7% sacarose e nos meios de Rogosa e MSBS. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C (5% CO₂ para MSBS e LAPTg), o número de colônias características em cada meio foi contado e o valor de logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC/ml) foi calculado. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se os testes *t* de Student e Mann-Whitney. Os valores de log UFC/mL foram significativamente maiores nas contagens obtidas com a utilização do LAPTg em relação às realizadas com MSBS. Por outro lado, os valores de log UFC/mL foram estatisticamente menores nas contagens de lactobacilos quando se utilizou o meio LAPTg em relação ao meio de Rogosa. Conclui-se que os resultados obtidos nas contagens de estreptococos do grupo mutans, utilizando os meios de cultura MSBS, LAPTg com 7% sacarose e Rogosa foram estatisticamente diferentes. Os resultados sugerem que o meio LAPTg 7% sacarose não pode ser considerado uma alternativa para o isolamento simultâneo de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. PALAVRAS-CHAVE: estreptococos do grupo mutans, lactobacilos, saliva, testes de atividade de cárie.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da atividade de cárie foi baseado durante muitos anos exclusivamente no conhecimento do número total de dentes ou superfícies apresentando lesões de cárie (WEYNE, 1986). Esta análise, porém, não acompanhava o caráter dinâmico do processo de cárie, não permitindo que novas lesões fossem efetivamente evitadas.

Visto que a microbiota é um dos fatores essenciais na etiologia da cárie (KEYES, 1969), as tentativas na obtenção de um bom método para se prever o risco de cárie tem se voltado cada vez mais para o uso dos testes microbiológicos (ALALUUSUA, 1993; CARVALHO; BEZERRA, 2003). O objetivo principal destes testes é identificar indivíduos que necessitem de medidas específicas para reduzir a velocidade de progressão da cárie. Alguns autores (BRATHALL; CARLSSON, 1988; CRALL et al., 1990) alertaram para a importância da determinação precoce do alto risco de cárie. Este conhecimento é extremamente importante para o clínico e em saúde pública, pois medidas preventivas mais intensas poderiam se concentrar apenas em indivíduos de alto risco, diminuindo o custo e aumentando a eficiência de programas de prevenção (FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE, 1988).

Os lactobacilos foram os primeiros microrganismos a serem considerados cariogênicos (VAN HOUTE, 1994), porém atualmente são correlacionados com progressão do processo carioso (ANDERSON; BALES;

OMNELL, 1993). Além disso, estão diretamente implicados com ingestão freqüente de carboidratos. Desta forma, contagens de lactobacilos podem ser usadas tanto para avaliação do risco de cárie como para verificar o efeito das alterações dietéticas (VAN HOUTE, 1981; CROSSNER, 1981; ALALUUSUA, 1993). Rogosa (1951) desenvolveu um meio seletivo para lactobacilos baseado na adição de um agente tensioativo (Tween 80) e uma mistura de sais, o qual é ainda o mais utilizado até a atualidade.

O importante papel etiológico dos estreptococos do grupo mutans no processo de cárie tem sido amplamente estudado por vários autores (HAMADA; SLADE, 1980; ZICKERT, 1982; GERMAINE, 1984; EMILSON, 1989), sendo a contagem deste grupo de microrganismos freqüentemente utilizada para o diagnóstico e propósitos predictivos em cariologia (SCHLAGENHAUF; ROSENDHAL, 1990; SEKI, 2003; KOGA-ITO et al., 2003). A relação entre alta contagem de *S. mutans* e alta atividade de cárie já foi estabelecida na literatura (ZICKERT, 1982; ALALUUSUA, 1993; ANDERSON; BALES; OMNELL, 1993). Contagens deste grupo de microrganismos também têm sido utilizados na avaliação dietética, já que seus níveis são bastante sensíveis à dieta (VAN HOUTE, 1993; GRINDEFJORD et al., 1995). O meio de cultura seletivo ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose é o mais utilizado para o isolamento de estreptococos do grupo mutans (GOLD et al., 1973). No entanto, vários outros meios foram sugeridos como alternativas, tais como o SB20 (DAVEY; ROGERS, 1984), GSTB (TANZER et al., 1984) e MS-MUT (HIRASAWA; TANAKA, 2003). Testa de Nadal et al. (1997) sugeriram um meio de cultura que permitiria a contagem simultânea de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos a partir de amostras de saliva.

Segundo estes autores, o LAPTg acrescido de 7% de sacarose permite a diferenciação desses grupos de microrganismos de acordo com a morfologia de colônia e produção de dextrano. A grande vantagem desse meio de cultura em relação ao MSBS e Rogosa seria a redução de custos e diminuição do tempo de processamento.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o meio de cultura LAPTg com 7% sacarose como alternativa para o meio Mitis Salivarius bacitracina sacarose (MSBS) e Rogosa no isolamento de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de saliva de 50 indivíduos, alunos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Todos os indivíduos foram informados sobre os propósitos da pesquisa e métodos de coleta das amostras. Quando da concordância por parte do paciente, este assinou o termo de autorização. O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP (nº070/2002, PH/CEP).

Amostras de saliva estimulada foram coletadas utilizando um pedaço de goma de mascar sem sabor em um recipiente universal estéril. Inicialmente a goma foi colocada na boca do paciente e deixada por 2 minutos, sendo a saliva acumulada nesse período deglutida. Foi solicitado ao paciente que mastigasse a goma e toda a saliva produzida foi coletada até a obtenção de um volume final de aproximadamente 2 mL.

Um mililitro da amostra de saliva foi diluída em 9 mL de solução de NaCl a 0,85% esterilizada, obtendo-se a seguir as diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} . A partir da saliva pura e de cada diluição, 0,1 mL foram semeados em duplicata em placas de Petri contendo os meios de cultura a serem testados.

O meio Mitis Salivarius (Difco) foi preparado a partir do meio comercial, sendo a concentração de sacarose ajustada para 20%. O meio de cultura foi autoclavado por 15 minutos a 121°C e então resfriado até aproximadamente 50°C. A seguir, a solução de bacitracina esterilizada por filtração (filtro JBRGP 2525, Millipore) foi adicionada em condições assépticas até a obtenção da concentração final de 0,2 UI/mL. As amostras de saliva foram inoculadas e após incubação por 72 horas a 37°C e 5% CO₂, as colônias escuras com aspecto de vidro esmerilhado, características de estreptococos do grupo mutans, foram contadas nas placas que continham de 30 a 300 colônias (contador de colônias Phoenix, modelo EC550A). A partir das contagens, foram obtidos os valores de logaritmo de unidades formadoras de colônias por mililitro (log UFC/mL).

O meio de LAPTg com 7% de sacarose foi preparado de acordo com a metodologia proposta por Testa de Nadal et al. (1997) e foi constituído por extrato de levedura 10 g, peptona 15 g, glicose 10 g, tiptona 10 g, Tween 80 1 mL, ágar 15 g, sacarose 70 g, água destilada 1000 mL (pH 6,8). Os componentes foram dissolvidos em água destilada, autoclavados a 121°C por 15 minutos e vertidos em placas de Petri esterilizadas.

As amostras de saliva e respectivas diluições foram semeadas e após incubação por 72 horas a 37°C e 5% CO₂, as colônias pequenas, translúcidas, com depósito de dextrano ao redor, características de *Streptococcus mutans* e

colônias grandes, brancas características de outros estreptococos do grupo mutans foram contadas. A partir desses dados, os valores de log UFC/mL foram calculados.

Os dados obtidos para isolamento de estreptococos do grupo mutans foram estatisticamente analisados aplicando-se o teste *t* de Student para comparação entre médias ($p \leq 0,05$). Os valores de log UFC/mL obtidos para a contagem de lactobacilos foram analisados, utilizando-se o teste de Mann-Whitney para comparação entre medianas ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados obtidos para a comparação entre LAPTg e MSBS estão apresentados na Tabela 1. Os valores médios de logaritmo de UFC/mL de estreptococos do grupo mutans obtidos no grupo LAPTg foram estatisticamente superiores aos observados quando o meio MSBS foi utilizado ($t=23,03$; $gl=98$; $p=0,001$).

Os valores de mediana de log de UFC/mL obtidos para as contagens de lactobacilos estão apresentados na Tabela 2. Os valores obtidos utilizando os dois meios de cultura testados foram diferentes estatisticamente ($p=0,001$), observando-se valor superior quando o meio de Rogosa foi utilizado.

Tabela 1- Valores de média e desvio-padrão do logaritmo de UFC/mL obtidos nas contagens de estreptococos do grupo mutans utilizando os meios de cultura LAPTg e MSBS (Mitis Salivarius bacitracina sacarose)

| Meios de cultura | n | Média | Desvio-padrão |
|------------------|----|-------|---------------|
| LAPTg | 50 | 7,08* | 0,50 |
| MSBS | 50 | 4,55 | 0,59 |

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao MSBS ($p=0,01$)

Tabela 2 - Valores de mediana do logaritmo de UFC/ml obtidos nas contagens de lactobacilos utilizando os meios de cultura LAPTg e Rogosa

| Meios de cultura | n | Mediana |
|------------------|----|---------|
| LAPTg | 50 | 1,908* |
| Rogosa | 50 | 5,477 |

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao meio de Rogosa ($p = 0,001$)

DISCUSSÃO

Contagens de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos são frequentemente utilizadas para o diagnóstico e propósitos predictivos em cariologia (SCHLAGENHAUF; ROSENDHAL, 1990; SEKI, 2003; KOGA-ITO et al., 2003). Um meio de cultura que permitisse a contagem simultânea destes microrganismos a partir de amostras de saliva seria de grande utilidade na Odontologia, facilitando o processamento e permitindo a obtenção de resultados rápidos (TESTA DE NADAL., 1997).

O meio de cultura rotineiramente utilizado para a contagem de lactobacilos é o meio de Rogosa, que graças a presença de Tween 80 e uma mistura de sais é satisfatoriamente seletivo para este microrganismo. O reconhecimento de colônias características (discóides) neste meio é bastante simples. Considerando-se o meio LAPTg, a verificação de colônias características, como descrito por Testa de Nadal (1997), é difícil e subjetiva, podendo levar a contagens inadequadas. De fato, resultados distintos foram obtidos com a utilização dos meios em teste. Em seis pacientes, verificou-se contagem negativa para lactobacilos utilizando o meio LAPTg e positiva quando da utilização do meio de Rogosa. Em uma situação observou-se o inverso.

O meio ágar Mitis salivarius foi inicialmente elaborado por Chapman (1944) o qual era acrescido de telurito de potássio e foi por muito tempo utilizado no isolamento de estreptococos da cavidade bucal. Posteriormente, Gold et al. (1973), propuseram a adição de 15% de sacarose e 0,2 UI de bacitracina por mililitro ao meio MS, surgindo o meio MSBS, o qual é ainda extensivamente utilizado (KOGA-ITO et al., 2003; SEKI, 2003). No entanto, o meio Mitis

Salivarius bacitracina sacarose (MSBS) possui custo bastante elevado e sua preparação é laboriosa. Outra desvantagem deste meio de cultura é o curto prazo de validade (7 dias), ditado pela presença da bacitracina na sua constituição.

Segundo Kimmel e Tinanoff (1991), o MSB leva a uma superestimação no número real de estreptococos do grupo mutans porque não suprime os estreptococos não-mutans, podendo levar a resultados falso-positivos. Por outro lado, Tanzer et al. (1984) consideram que o MSBS é parcialmente seletivo e subestima a presença de estreptococos do grupo mutans. Em nosso trabalho, verificamos um número de UFC/mL significativamente superior nas contagens realizadas com LAPTg.

A identificação de um número expressivo de amostras obtidas através da utilização do LAPTg seria importante para confirmar a validade da correlação entre morfologia de colônia e grupo de microrganismo.

Segundo Testa de Nadal et al. (1997), o meio permitiria uma fácil diferenciação entre as colônias de *S. mutans*, outras espécies de estreptococos e lactobacilos. As colônias características de *S. mutans* deveriam ser pequenas, translúcidas e com depósito de dextrano ao redor e colônias grandes e brancas para outros estreptococos do grupo mutans. As colônias de lactobacilos seriam de tamanho médio e amareladas. Apesar de terem sido realizadas sementeiras com cepas padrão com o objetivo de reconhecer colônias de interesse, observamos que a diferenciação de colônias de estreptococos e de lactobacilos é bastante complicada e subjetiva, o que pode levar a obtenção de resultados não satisfatórios.

CONCLUSÕES

Conclui-se que os resultados obtidos nas contagens de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, utilizando os meios de cultura MSBS, LAPTg com 7% sacarose e Rogosa não foram compatíveis. Os resultados sugerem que meio LAPTg 7% sacarose não pode ser considerado uma alternativa para o isolamento simultâneo de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos.

ABSTRACT

The important etiologic role of mutans streptococci and lactobacilli in the caries process has been extensively studied by several authors and counts of these groups of microorganisms are frequently employed for diagnosis and predictive purposes in cariology. The culture medium LAPTg was developed for the simultaneous counts of mutans streptococci and lactobacilli from saliva samples and has the great advantage of being cheaper and easy to prepare. The aim of this study was to evaluate the medium LAPTg 7% sacarose as a possible alternative for the media agar Mitis Salivarius bacitracin sacarose (MSBS) and Rogosa, that are the most used media for the isolation of mutans streptococci and lactobacilli, respectively. Saliva samples were collected from 50 individuals, students of Odontology graduation course, and were diluted and plated on the media LAPTg 7% sacarose, Rogosa and MSBS. After the incubation period of h at 37°C (5% CO₂ in case of LAPTg and MSBS) the number of characteristics colonies in each medium was counted and the values of the logarithm of colonies forming units per mililitre (log UFC/ml) were calculated. The results were statistically analyzed by Student's and Mann-Whitney tests. The values of log UFC/mL were significantly higher in the counts obtained with the use of LAPTg in relation to those obtained with MSBS. On the other hand, the values of log UFC/mL were statistically lower in the counts of lactobacilli when LAPTg was used in relation to Rogosa. It could be concluded that the results obtained for mutans streptococci and lactobacilli counts, using the media MSBS, Rogosa e LAPTg 7% sacarose were statistically different. The results suggest that the medium LAPTg 7% sacarose can not be considered an alternative for the simultaneous isolation of mutans streptococci and lactobacilli.

KEY-WORDS: mutans streptococci, lactobacilli, saliva, caries risk tests.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALUUSUA S. Salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli and past caries experience in caries prediction. *Caries Res.*, v. 27, p. 68-71, 1993.

- ANDERSON, M. H., BALES, D. J.; OMNELL, K. Modern management of dental caries: the cutting edge is not the dental bur. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 124, p. 37-44, 1993.
- BRATHALL C.; CARLSSON J. Estado atual dos testes de atividade de cárie. In: Thystrup A, Fejerskov O. *Tratado de cariologia*. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 1988.
- CARVALHO, C. K.; BEZERRA, A. C. Microbiological assessment of saliva from children subsequent to atraumatic restorative treatment (ART). *Int. J. Paediatr. Dent.*, v. 13, n. 3, p. 186-192, 2003.
- CRALL J. J. et al. Relationship of microbiological, social and environmental variables to caries status in young children. *Pediatr. Dent.*, v. 12, p. 233-236, 1990.
- CROSSNER, C. G. Salivary lactobacilli counts in the prediction of caries activity. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 9, p. 182-190, 1981.
- DARVEY, 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, p. 453-460, 1984.
- EMILSON, C. G.; KRASSE B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 93, p. 96-104, 1985.
- FÉDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE. Review of methods of identification of high caries risk groups and individuals. *Int. Dent. J.*, v. 38, p. 177-189, 1988.
- GERMAINE G. R. Infant infection with *Streptococcus mutans*: source and prevention. *North. Dent.*, v. 63, p. 18-20, 1984.
- GOLD, O. G. et al. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, v. 18, p. 1357-1364, 1973.
- GRINDEFJORD, J. et al. Caries development in children from 2.5 to 3.5 years of age: a longitudinal study. *Caries Res.*, v. 29, p. 499-454, 1995.
- HAMADA S.; SLADE N. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, v. 44, p. 331-384, 1980.
- HIRASAWA, J.; TANAKA, K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. *Caries Res.*, v. 37, n. 3, p. 212-217.
- KEYES, P. H. Presence and future measures for dental caries control. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 79, p. 1395-1404, 1969.
- KIMMEL L.; TINANOFF, N. A modified mitis salivarius medium or caries diagnostic test. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 6, p. 275-279, 1991.
- KOGA-ITO, C. Y. et al. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. *Caries Res.*, v. 36, n. 1, p. 38-43.
- ROGOSA, M. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J. Dent. Res.*, v. 30, p. 682, 1951.

SCHALGENHAUF, V.; ROSENDAHL, R. Clinical and microbiological caries-risk parameters at different stages of dental development. *J. Pedod.*, v. 14, p. 141-143, 1990.

TANZER, J. M. et al. Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of *Streptococcus mutans*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 20, p. 653-659, 1984.

TESTA DE NADAL, M. M. et al. A culture medium for simultaneous counts of *Streptococcus mutans* and lactobacillii in saliva. *Acta Odontol. Latinoam.*, v. 10, p. 35-45, 1997.

SEKI, M. et al. Evaluation of mutans streptococci in plaque and saliva: correlation with caries development in preschool children. *J. Dent.*, v. 31, n. 4, p. 283-290.

VAN HOUTE, J. Lactobacillii in human dental plaque and saliva. *J. Dent. Res.*, v. 60, p. 2-5, 1981.

VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv. Dent. Res.*, v. 7, p. 87-96, 1993.

VAN HOUTE, J. Role of microorganisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, v. 73, p. 672-681, 1994.

WEYNE, S. Cariologia. In: Baratieri LM et al. *Dentística: procedimientos preventivos e restauradores*. Rio de Janeiro: Ed. Quintessence, 1992, p. 1-42.

ZICKERT I. et al. *Streptococcus mutans*, lactobacilli and dental health in 13-14 year-old Swedish children. *Comm. Dent. Oral Epidemiol.*, v. 10, p. 71-81, 1982.