

ESPIROQUETAS DA BÔCA

Djalma de Oliveira Belli

Instrutor de Ensino de Clínica Odontológica 2ª Cadeira.

SINOPSE:

Revisão bibliográfica sobre «espiroquetas da boca», desde o início dos estudos destes microorganismos até o estado atual dos conhecimentos. Estudo de algumas técnicas de cultivo e descrição da experiência pessoal em cultivo de material retirado de bolsas gengivais.

INTRODUÇÃO

A Bôca é o principal habitat de espiroquetas e, embora, segundo KLEIN (1), não haja até o presente nenhuma prova clínica nem experimental de que as espiroquetas sôzinhas possam causar doenças na cavidade oral humana, um estudo destes microrganismos se impõe, porquanto em muitas moléstias parodontais, da mucosa oral, do faringe, das amígdalas, da língua ou dos seios maxilares se encontram estas formas espiraladas em associação com outros microrganismos, tais co-

mo bacilos, vibriões e cocos. O melhor exemplo de associação microbiana, em que as espiroquetas ocupam posição de destaque, é a associação fuso-espirilar ou, melhor denominada, fuso-espiroquética, que tem sido responsabilizada como agente causante da «doença de Vincent», que inclui gengivite, estomatite e angina.

APPLETON (2) afirma que «por causa das dificuldades técnicas em isolar estes organismos e em fazê-los crescer em cultura pura, existe grande incerteza acêrca de problemas como: (1) Quantas espécies diferentes existem? (2) quais são suas relações taxonômicas e (3) sua patogenicidade?»

O próprio reconhecimento morfológico e diferenciação entre os diferentes gêneros e espécies se torna impossível em esfregaços corados, sendo dificultoso, embora factível, na observação das formas vivas, com a técnica da iluminação em campo escuro.

Propusêmo-nos um trabalho de

Trabalho elaborado quando do Estágio na Cadeira de Microbiologia, sob a orientação do Prof. Paulo Louro Filho.

pesquisa sôbre as espécies espiroquéticas encontradas na bôca, dividindo o nosso trabalho nas seguintes partes:

- 1) Histórico
- 2) Estado atual do conhecimento
- 3) Técnicas de cultivo preconizadas
- 4) Nossa experiência pessoal em cultivo.

HISTÓRICO

Grande tem sido a confusão em tôrno destas formas microbianas espiraladas. APPLETON (2) diz que a maioria da literatura não tem valor e serve apenas para confundir.

O primeiro a observar espiroquetas bucais foi Antônio van Leeuwenhoek, em târtaro retirado de seus próprios dentes (3).

Em 1875 Cohn encontrou espiroquetas nos depósitos mucóides dos dentes e dois anos mais tarde também Koch observava êstes microorganismos, como habitantes constantes da cavidade bucal humana. Afirmava ainda Koch, segundo APPLETON (2) serem formas semelhantes às dos organismos da febre recorrente e que eram muito variáveis em comprimento e espessura. Trevisan incluiu as formas descritas por Koch e Cohn numa espécie única, a que denominou de «*Spirochaeta cohnii*».

Pouco tempo mais tarde, já se reconheciam duas espécies diferentes, uma maior e outra menor, que tomaram os nomes respectivos de «*Spirochaeta buccalis*» e de «*Spirochaeta*

dentium ou *denticola*». MILLER, em 1890 (4) descreve com detalhes uma forma de espirochaeta («*S. dentium* ou *denticola*»), embora reconheça a existência das duas espécies.

Posteriormente, von Prowazek aplicou o nome de «*Spirochaeta media*» a uma forma intermediária descrita por Hofmann. Temos assim três espécies diferentes: uma forma grande, uma pequena e uma média.

Hartman e Muehlens reconheceram 4 espiroquetas bucais, a saber: *S. buccalis*, *S. media*, *S. dentium* e *S. vincentii*, embora Muehlens não estivesse plenamente convencido de que o último fôsse um microrganismo diferente da *S. media* ou da *S. buccalis*.

Outros autores descreveram outros tipos e fizeram classificações diversas, que só vieram trazer mais confusão ao assunto. Em 1918 Noguchi apresentou uma classificação, já superada, mas que serve de base para as atuais.

ESTADO ATUAL DOS CONHECIMENTOS

Os microrganismos de forma espiralada estão, de acôrdo com o Manual de BERGEY (5) enquadrados dentro de duas Ordens distintas: Eubacteriales e Spirochaetales. A primeira Ordem apresenta 13 Famílias. Na Família II, Pseudomonadaceae, Tribo II, Spirilleae encontramos os microrganismos que se descrevem como «células mais ou menos encurvadas espiralmente». Essa Tribo, por sua vez, conta com 6 Gêneros, os quatro primeiros englobando os

Vibriões, ou sejam, secções de espira e os dois últimos contendo as formas em espiral pròpriamente ditas: são os chamados Espirilos.

Os dois Gêneros de Espirilos são Thiospira e Spirillum. O Gênero Spirillum possui uma espécie bucal, o Spirillum sputigenum. São as seguintes, resumidamente, as características gerais do Gênero:

Forma: Espiral rígida, com cílios em uma ou em ambas as extremidades.

Respiração: Aeróbios, com poucas exceções, sendo uma delas a espécie bucal, que é anaeróbia.

Coloração: Gram-negativos.

Patogenicidade: A maioria é saprófita, sendo poucas espécies patogênicas.

Dimensões: Comprimento que varia de 1 a 50 micra.

Espécie habitante da Cavidade Bucal: SPIRILLUM SPUTIGENUM.

É um microrganismo anaeróbio, que tem sido confundido por muitos com o vibrião colérico, por suas similitudes morfológicas e tintoriais e ainda com a espiroqueta de Vincent e com o bacilo fusiforme. Tem a forma de vírgula, com 0,1 a 0,3 de micro de espessura por 1 a 2,5 micra; apresentam-se agrupados, formando um S ou um V; locomovem-se ativamente com movimentos vibrioniformes ou em espiral; são Gram-negativos como as demais espécies do Gênero; têm um ou dois cílios, que emergem do lado côncavo, podendo às vezes apresentar vários cílios muito

finos; não se desenvolvem em meio de cultivo comum e nos especiais o fazem com dificuldade, razão pela qual seu estudo tem sido feito de forma incompleta. DERUBE Y MARTÍNEZ (6) conseguiram cultivá-los em meios de gelose-sôro e gelose-placenta.

ORDEM SPIROCHAETALES

A maioria dos microorganismos espiralados, as verdadeiras ESPIROQUETAS (do grego Speira = espira e Chafta = cabelo), pertence a esta Ordem. Descreveremos, portanto, os caracteres gerais das diversas espécies nela classificadas:

Forma: Espiral ou ondulada

Tamanho: Variável de 3 até 500 micra de comprimento.

Estrutura: Corpo flexível e contrátil. Ausência de núcleo demonstrável até o presente. Existe um filamento axial, à guisa de mola, em torno do qual se dispõe o protoplasma contrátil. Afirma-se a existência de u'a membrana protoplasmática. Ao microscópio eletrônico nota-se a presença de grânulos, que parecem estar relacionados com a reprodução, pois estes grânulos são filtráveis, através de filtros de porcelana ou diatomita e o material filtrado reproduz espiroquetas, mediante cultivo. O microscópio eletrônico, todavia, não confirmou a presença de filamento axial, nem da membrana protoplasmática; acusou, entretanto a presença de flagelos, estrutura anteriormente negada.

Locomoção: Todas as espécies são móveis, à custa de contrações do próprio corpo celular. Não se sabe se os cílios ou flagelos observados ao microscópio eletrônico estão relacionados com a motilidade.

Reprodução: A multiplicação se faz por divisão transversa, embora NOGUCHI (7) haja observado fissuração longitudinal em cultivos de algumas formas de *Treponema*.

Coloração: Método de Burri, impregnação argêntica ou pela técnica de Giemsa. As técnicas usuais não os coram bem, com exceção de um Gênero (*Borrelia*) que recebe bem os corantes comuns de anilina. Tratados pelo Gram, são negativos. A melhor maneira de observá-los, entretanto, é através da iluminação em campo escuro.

Cultivo: São muito exigentes com respeito à nutrição. Há vários meios seletivos, todos eles baseados em ágar mais líquidos orgânicos, como soro, líquido ascítico, sangue desfibrinado, infusão de coração, etc., acrescentando-se, para a obtenção de culturas puras, tecido fresco de rim, fígado ou testículo de animais, embora a adição destes tecidos não seja um requisito indispensável para todas as amostras de espiroquetas. Exigem-se condições de perfeita anaerobiose.

Respiração: Em geral anaeróbios, com poucas exceções, como algumas espécies do Gênero *Leptospira*.

A Ordem Spirochaetales conta com duas grandes Famílias: Família I — SPIROCHAETACEAE, que inclui as formas maiores, de vida saprofítica, encontradas em lodaçais e águas estagnadas e de nenhum interesse médico e a Família II — TREPONEMATACEAE, que possui três Gêneros, todos englobando espécies altamente patogênicas. São formas menores, geralmente parasitas no homem e em animais. Dentro destes três Gêneros, que são *BORRELIA*, *TREPONEMA* e *LEPTOSPIRA*, é que vamos encontrar as espécies bucais. Estudaremos, porisso, os caracteres gerais de cada um dos Gêneros e as espécies bucais neles contidas.

Gênero I — *BORRELIA*: As espécies deste Gênero medem de 8 a 16 micra de comprimento e possuem de 3 a 5 espiras grandes, rasas e irregulares, terminando-se geralmente em finos filamentos. Coram-se facilmente pelos corantes comuns de anilina, comportando-se negativamente frente ao Gram. Têm índice de refração aproximadamente idêntico ao das verdadeiras bactérias. Geralmente hematófilos, encontram-se nas membranas mucosas. Alguns são transmitidos por mordidas de artrópodos.

ESPÉCIES BUCAIS

BORRELIA VINCENTII — É um habitante normal da cavidade bucal. A designação deste nome específico é atribuída a Blanchard. Era a princípio incerto se este era um mi-

crorganismo aparte ou se era a mesma *S. Buccalis* ou a *S. media*. A primeira exposição clara deve-se a Thomson e Thomson: «Em nossa opinião a espiroqueta vincenti (ou o que nós consideramos ser a *S. vincenti*) pode ser reconhecida como diferente da *S. buccalis*, pois é uma espiroqueta mais delgada, não semelhante a fita e as curvas são mais regulares, devido à maior flexibilidade do corpo» (apud APPLETON) (2).

Morfologia: 0,3 de micron de espessura por 8 a 12 micra de comprimento; 3 a 8 curvas rasas e irregulares; cora-se facilmente com os corantes comuns de anilina e é Gram-negativo.

Motilidade: tem um movimento progressivo e vibratório rápido.

Habitat: Encontrado na membrana mucosa respiratória normal, nos sulcos gengivais e associado com o bacilo fusiforme na doença de Vincent.

Patogenicidade: Atribui-se à sua associação com o *B. fusiformis* a etiologia da gengivite, estomatite e angina de Vincent. Não é, entretanto, patogênico quando inoculado em animais de laboratório.

Cultivo: Pode ser cultivado em condições de estrita anaerobiose.

BORRELIA BUCCALIS — É a maior das espiroquetas bucais, medindo 0,4 a 0,9 de micron de espessura por 7 a 20 micra de comprimento. Sua motilidade é ativa, ser-

pentina, rotatória e flexuosa. Toma o violeta na coloração de Giemsa. Não se obteve até hoje cultura pura e provavelmente não cresce em nenhum dos meios conhecidos. Existe nas bocas consideradas normais e invade as lesões formadas na mucosa respiratória.

Gênero II — TREPONEMA — As espécies que constituem este Gênero têm tamanho variável de 3 a 18 micra, apresentando espiras pequenas e agudas, regulares ou irregulares. As extremidades são afiladas, podendo ter um filamento terminal. O microscópio eletrônico demonstrou a presença de flagelos em algumas espécies. São cultiváveis em ambiente anaeróbio. Parasitas e patogênicos no homem e outros animais, geralmente produzem lesão local.

ESPÉCIES BUCAIS

TREPONEMA MICRODENTIIUM
— Era incluído antes nas velhas espécies *Spirochaeta dentium* e *Spirochaeta denticola*, até que NOGUCHI o isolou e descreveu em 1912. (7). Apresenta as seguintes características: diâmetro de 0,25 de micron na parte central, afilando-se gradualmente para as extremidades; curto nas formas jovens, podendo, entretanto, alcançar maior comprimento, quando envelhecido (8 micra); 14 curvas em média; sua motilidade é rotatória ativa; uma projeção como flagelo é às vezes observada em uma ou em ambas as extremidades; no-

tou-se divisão longitudinal, o que o faria distinguir-se dos demais componentes da Ordem a que pertence; coagulam levemente os constituintes do sôro do meio em que é cultivado e a cultura emite um odor fétido.

TREPONEMA MACRODENTIIUM

— Esta espécie seria provavelmente a *Spirochaeta media* de von Proszek. Foi cultivado por NOGUCHI (7) em ágar-sôro-tecido. Em culturas jovens os microrganismos são curtos e grossos, com curvas rasas e irregulares, as extremidades adelgaçando-se abruptamente. A motilidade se faz graças às vigorosas vibrações ou oscilações do corpo. Projeções como flagelos longos e delicados em uma ou em ambas as extremidades. Largura de 0,7 a 1 micron e comprimento de 3 a 8 micra. As culturas mais velhas apresentam formas mais longas (12 micra ou mais) e mais delgadas, com curvas mais regulares, e afinando-se mais gradualmente para as extremidades, sendo também maior o número de curvas: 14 ou mais.

TREPONEMA MUCOSUM — Foi isolado e descrito por Noguchi em 1913. Até então teria sido provavelmente incluído na espécie conhecida como *Spirochaeta dentium*. Morfológicamente assemelha-se intimamente com o *Treponema pallidum* e com o *T. microdentium*, dos quais cumpre diferenciar. Sua similitude com o último se conserva ainda nas afinidades tintoriais, pois no método de Giemsa toma o vermelho, como aquele, porém dêle se diferencia, por pro-

duzir mucina e ter na cultura um odor fétido mais forte e um crescimento mais denso. Do *T. pallidum* se distingue por não ser de patogenicidade conhecida. São suas características: 8 a 12 micra de comprimento por 0,25 a 0,3 de largura. O número de curvas varia de 6 a 8 e as extremidades são muito agudas e às vezes possuem uma projeção fina e curvada, que pode atingir até 8 ou 10 micra de extensão.

Gênero III — LEPTOSPIRA — Caracteres gerais: Corpo em espirais delgadas (*Leptos*=fino), são as mais delicadas das espiroquetas. As curvas são tão pequenas e juntas, que aparecem na iluminação em campo escuro, como um rosário de contas iluminadas, uma vez que só se enxergam as maiores amplitudes das curvaturas. Têm o comprimento variável entre 6 a 20 micra. São em geral aeróbias e as mais facilmente cultiváveis das espiroquetas. Um dado peculiar é que têm uma ou ambas as extremidades recurvadas em gancho.

ESPÉCIE BUCAL

LEPTOSPIRA DENTIIUM — Pouco estudada, é uma espécie anaeróbia. Quem primeiro chamou a atenção para esta espécie foi Erich Hoffmann em 1920, denominando-a *S. trimero-donta*. E' encontrada comumente na cavidade bucal, mas o seu número parece decrescer muito quando aumenta a flora bacteriana ou espiroquética, como na estomatite de Vincent.

TÉCNICAS DE CULTIVO PRECONIZADAS

Inúmeras têm sido as técnicas e os meios de cultivo utilizados para a obtenção de culturas puras dos microrganismos estudados. Nem todas, porém, podem garantir um êxito fácil. O crescimento e manutenção de formas vivas de espiroquetas bucais em cultivos mistos, é, porém, de relativa facilidade.

NOGUCHI (7) empregou para o cultivo de espiroquetas bucais a inoculação de material retirado de depósitos dentários, primeiramente em tubos contendo ágar-sôro de ovelha e pedaços de tecido, recoberto com uma camada de óleo de parafina; depois de um crescimento inicial neste meio, em incubação de 37°C, o material era levado para um outro meio, composto de ágar-sôro e pedaços de tecido e igualmente recoberto com óleo de parafina. Assim, obteve êle neste segundo meio, culturas puras de *Treponema macrodentium* e *Treponema microdentium*.

Klein (1) introduziu um método que nos pareceu de fácil realização, o qual empregamos, com ligeiras modificações. É a seguinte a sua técnica:

a) O fundo de uma placa de Petri pequena, de bordos baixos, contendo ágar comum, é semeado com *Bacillus prodigiosus* e prêso por uma bolinha de plastilina a uma lâmina quadrada de vidro.

b) A tampa de uma placa de Petri grande, com substrato constituído de 2 partes de ágar a 2%, uma parte de caldo e uma parte de sôro inativado de cavalo, é semeada com

material retirado de bolsas gengivais, após o que, é colocada, com a superfície do substrato virada para baixo, sobre o fundo da placa pequena e isolada do ar com plastilina.

c) A semeadura do material retirado das bolsas gengivais com uma alça de platina, quando é feita em superfície, dá culturas mistas, que não crescem em placas secundárias. Assim, o autor aconselha a semeadura em profundidade, fazendo sulcos com a alça de platina no substrato, obtendo desta forma uma imitação dos sulcos gengivais. Com esta técnica êle conseguiu culturas mistas que, quando transferidas para um substrato da mesma composição, porém acrescido de pedaços de tecido fresco de animais (rins ou testículos de coelho ou carneiro), dava culturas puras de espiroquetas.

NOSSA EXPERIÊNCIA EM CULTIVO

Empregamos o método de Klein, modificando apenas as placas e a maneira de isolá-las do ar. Usamos tanto para a semeadura do bacilo aeróbico (*Serratia marcescens*), como para a do material retirado de bolsas gengivais, as tampas de duas placas de Petri de idêntico diâmetro e, após a semeadura de ambas nos mesmos meios e com a mesma técnica aconselhados pelo autor, justapômo-las pelos bordos e vedamos a fenda entre ambas, com uma tira de esparadrapo. Conseguimos assim anaerobiose satisfatória. A incubação por 24 horas, a 37°C já apresentava crescimento, tanto em superfície como

em profundidade. O crescimento apresentava-se enevoadado e tinha um odor fétido característico, aumentando progressivamente de diâmetro até o 7º dia. Observamos que após este tempo as culturas não sobreviviam no mesmo substrato, mas se transferidas para um novo substrato, durante o período de crescimento (do 1º ao 7º dia), reproduziam-se da mesma maneira. A observação em campo escuro mostrou cultura mista, onde se viam bactérias e espiroquetas ativas, em formas que nos permitiram identificar os três gêneros *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*. Não tentamos, entretanto, transferir o material cultivado de forma impura, para placas contendo pedaços de tecido fresco de animais, de sorte que não conseguimos obter culturas puras.

SINOPSIS:

The literature about «mouth spirochaetae» was reviewed from the beginning of the study on these microorganisms to the actual state of knowledge. Some culture techniques and experience in culturing material originated from gingival pockets were studied.

BIBLIOGRAFIA

1. KLEIN, H. S. — Oral spirochetes, their occurrence in diseases of the oral cavity and a simple method of pure cultivation. *Acta Odontologica Scandinavica*, Suecia, 5:1, 1943.
2. APPLETON, J. L. T. — Bacterial infection with special reference to dental practice. 4. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1950.
3. SEEGER, J. & DIRUBE, J. — Los espiroquetas en la cavidad oral. Buenos Aires, Cát. de Microbiologia de la Facultad de Odontologia, Universidad de Buenos Aires.
4. MILLER, W. D. — Micro organisms of the human mouth. Philadelphia. S. S. White, 1890.
5. BREED, R. S. et alii — Bergey's manual of determinative bacteriology. 6. ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1948.
6. DIRUBE, J. & MARTINEZ, R. — *Spirillum sputigenum*; técnica de su cultivo. Buenos Aires, Cát. de Microbiologia de la Facultad de Odontologia, Universidad de Buenos Aires.
7. NOGUCHI, H. — Cultural studies on mouth spirochaetae (*Treponema microdentium* and *macrodentium*) *Journal of Experimental Medicine*, 15:81, 1912.
8. ZINSSER, H. & BAYNE-JONES, S. — Tratado de bacteriologia. Rio de Janeiro, Imp. Nacional, 1947.
9. BIER, O. — Bacteriologia e imunologia. 7. ed. [São Paulo] Melhoramentos, 1955.
10. BUCHANAN, R. E. & BUCHANAN, E. D. — Bacteriology. 5. ed. New York, MacMillan, 1955.
11. FROBISHER, M. — Fundamentals of bacteriology. 5. ed. Philadelphia, Saunders, 1953.