

ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO BACTERIANA DA CAVIDADE ORAL, ANTES E APÓS ESCOVAÇÃO DENTÁRIA EM CÃES SADIOS.

**CAOVILLA, T.*¹; ROCHA, D.T.²; CEMBRANEL, D.J.²; BENETTI, M.²;
LÜBECK, I.³; CARNEIRO, M.V.³, MÜLLER, G.⁴.**

INTRODUÇÃO

No passado as afecções dentárias dos animais de estimação freqüentemente passavam despercebidas, eram negligenciadas ou tratadas de modo incorreto (WEST-HYDE & FLOYD, 1997). Porém, nos últimos anos, maior atenção tem sido dada à saúde bucal dos animais de estimação, dentre os quais o cão em especial, em virtude da evolução da Odontologia Veterinária e da maior exigência por parte dos proprietários (DORN, 1998), uma vez que a saúde bucal está diretamente relacionada com a saúde geral do animal (CORRÊA, 2006). Dentre as várias doenças da cavidade oral, a doença periodontal tem sido reconhecida nos últimos 100 anos como uma condição de alta incidência nos cães (MURRAY et al., 2003). A doença periodontal caracteriza-se pela presença de danos às estruturas de sustentação e proteção dos dentes, podendo ocasionar, quando de curso crônico, perturbações sistêmicas como bronquite, endocardite, hepatite, nefrite, entre outros. A placa bacteriana é o fator primário na formação de gengivite, pois é capaz de danificar o periodonto, culminando com a formação de cálculo dental, halitose e, por fim, a perda dos dentes. Esta placa bacteriana ou biofilme forma-se dentro de algumas poucas horas após profilaxia dental e compõem-se de proteínas, células mortas e de descamação, saliva, restos alimentares e, principalmente, bactérias (MURRAY et al. 2003; CORRÊA, 2006; LEPINE & COX, 2006), as quais se constituem daquelas que fazem parte da flora bucal normal, como bactérias gram-positivas aeróbicas (DORN, 1998; HIRSCH, 2003; LEPINE & COX, 2006). Uma vez acumuladas na margem gengival, as bactérias começam a se aderir e multiplicar e, com a progressão do processo, o cálculo dental se estabelece pela mineralização dentre e entre os restos bacterianos presentes na placa (MURRAY et al., 2003; LEPINE & COX, 2006). A doença periodontal é episódica ou cíclica, compreende períodos de exacerbação e remissão (WEST-HYDE & FLOYD, 1997) e não tem cura (GIOSO & CARVALHO, 2004). Portanto, a saúde bucal dos cães está na dependência da realização de medidas profiláticas como a utilização de brinquedos mastigáveis, couros palatáveis e biscoitos de cereais que auxiliem na limpeza dos dentes; além da administração de alimentação seca, com grânulos formulados em tamanhos específicos, que proporcionem a remoção da placa ou contendo substâncias que evitem a formação da mesma e do cálculo dental, como o complexo enzimático (WEST-HYDE & FLOYD, 1997;

1 Acadêmica do curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC); Pesquisadora/Bolsista. E-mail: tainacaovilla@yahoo.com.br

2 Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC); Colaboradores. E-mail: danitonini@hotmail.com ; diogocembranelvet@hotmail.com ; maycon_med_vet@hotmail.com ;

3 Professores colaboradores dos cursos de Medicina Veterinária e do departamento de Estatística da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC). E-mail: irinalubeck@hotmail.com . marcus@unoescxxe.edu.br.

4 Professora do curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC); Pesquisadora/Orientadora. E-mail: grazimuller@hotmail.com ;

GIOSO & CARVALHO, 2004; CORRÊA, 2006; LEPINE & COX, 2006). Entretanto, nenhuma delas é tão eficaz quanto à escovação dentária, recomendada como o método preventivo mais efetivo, e realizada com utilização de dentrífcios específicos, disponíveis em uma série de formulações, para a remoção da placa bacteriana e prevenção do cálculo dental (WEST-HYDE & FLOYD, 1997; GROVE, 2000). Segundo Paiva (2004), a escovação dentária somente também tem sido recomendada e considerada eficiente para a remoção da placa bacteriana e, ela tem sido recomendada em cães, três vezes por semana (TROMP et al., 1986; LIMA et al., 2004). Porém em animais já comprometidos pela doença periodontal, recomenda-se que sejam feitas escovações dentárias diárias (GIOSO & CARVALHO, 2004).

OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo fazer o isolamento e quantificação bacteriana do sulco gengival, antes e após a escovação dentária, em cães saudáveis, comparando-se dois dentrífcios utilizados em Odontologia Veterinária.

METODOLOGIA

As amostras foram colhidas de oito cães saudáveis, de diversas idades e raças. Todos os animais passaram por exame físico e da cavidade oral completo prévio para verificação da saúde geral e oral do animal e, após constatação de higiene, os mesmos foram submetidos a quatro tratamentos, em quatro períodos de tempo diferentes. O exame físico foi realizado como de rotina e no específico da cavidade oral foram levados em consideração: gengivas rosadas e sem hiperemia, pus ou sangramento; ausência de cálculo dental, doença periodontal e halitose. A presença da placa bacteriana foi determinada com a colocação de violeta de genciana 0,1% sobre a superfície vestibular e labial dos dentes, embebida em algodão hidrófilo, segundo técnica descrita por EURIDES et al. (1996). Uso de tratamento antimicrobiano sistêmico e higiene bucal regular foram utilizados como critério de exclusão de animais. Após a seleção prévia dos animais, os mesmos foram submetidos aos tratamentos, conforme se segue e nesta mesma ordem, sendo o período de intervalo de 30 dias entre os mesmos. Controle (Grupo G0): os animais foram submetidos somente às coletas de amostras nos quatro tempos diferentes, sem nenhuma escovação; tratamento 1 (Grupo G1): os animais foram submetidos à escovação dentária com solução fisiológica 0,9% estéril e às coletas de amostras; tratamento 2 (Grupo G2): os animais foram submetidos, à escovação dentária com pasta dental formulada à base de tiocianato de potássio, glicose oxidase, lactoperoxidase, sorbitol, benzoato de sódio, sílica hidratada, glicerina, dextrose, goma xantina, flavorizante, água purificada, sulfato bicálcico anidro, monofluorofosfato de sódio e dióxido de titânio, e à coleta de amostras; tratamento 3 (Grupo G3): os animais foram submetidos à escovação dentária com pasta à base de polímero carboxílico e propilenoglicol e, como os demais, à coleta de amostras. Estas últimas foram coletadas mediante utilização de um swab estéril previamente umedecido em água destilada estéril. O swab era rotacionado sobre a superfície vestibular e labial dos dentes em que houve evidência de placa bacteriana, após a aplicação da violeta de genciana 0,1%, e sobre as gengivas dos animais. Em seguida, a amostra era colocada em um tubo contendo água destilada estéril, com a finalidade de conservar as amostras até a chegada das mesmas ao laboratório.

Para isso, o material obtido na coleta era armazenado em uma caixa térmica com gelo e, em seguida, encaminhado para o laboratório em um prazo máximo de 48 horas. A primeira amostra era obtida, em todos os grupos, imediatamente antes da escovação dentária (T0), assim como as seguintes eram coletadas nos tempos, conforme se segue: uma hora (T1), cinco horas (T2) e 24 horas (T3) após a escovação dentária. As escovações dentárias foram realizadas utilizando-se as técnicas de Bass e de Stillman modificadas, qual seja: inicialmente e depois de segurados os lábios do animal, mantendo-se a boca fechada, era iniciada a escovação das faces vestibulares e labiais dos dentes incisivos e caninos. Na seqüência, com a boca do animal aberta, as faces vestibulares dos dentes pré-molares e molares também eram escovadas. Para isso, a escova era conduzida girando-a várias vezes, em movimentos circulares, com a superposição de vários dentes. Após, a mesma era passada arrastando-se verticalmente sua cabeça, coronalmente, para fora dos dentes, de modo que as cerdas pudessem realizar a remoção adicional da placa bacteriana. Em seguida, a escova era reposicionada numa nova seção de dentes, continuando-se o procedimento sistematicamente até que todas as faces dos dentes tivessem sido escovadas (vestibular, labial, oclusal e lingual – se o animal permitisse). A escova dental foi aplicada à interface gengivodental num ângulo de 45° para maximizar a limpeza do sulco gengival. As seções de escovação tinham duração média de dois a três minutos, dependendo do comportamento do animal (GIOSO & CARVALHO, 2004). A escovação dentária era realizada sempre pela mesma pessoa, a fim de minimizar variações e, para este procedimento, foram utilizadas dedeiras de borracha em monobloco, com 22 x 9 fileiras de cerdas, individuais para cada animal. Estas eram lavadas e deixadas em uma solução com hipoclorito de sódio, por aproximadamente uma hora, antes da utilização em outro tratamento (LIMA et al., 2004). No laboratório, todas as amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar McConkey, incubadas em estufa a 37°C por 24-48 horas e, após constatado o crescimento de colônias, procedia-se a primária das bactérias, observando-se as características das colônias. Também eram utilizados para essa identificação, métodos de coloração de gram e testes de catalase e oxidase, motilidade e oxidação-fermentação para identificação do gênero. Além disso, as amostras foram semeadas em PCA (Agar Padrão Contagem) para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). As suspensões bacterianas eram preparadas por meio de diluições decimais, de 10^{-1} a 10^{-7} , as quais eram posteriormente semeadas em PCA e incubadas por 48 horas, a 37°C para a posterior contagem. Esta última foi feita em placas contendo entre 30 e 300 colônias. Após a contagem e correção do valor, este era multiplicado por quatro em virtude das quatro faces dos dentes. Os resultados foram analisados por ANOVA, teste tukey para comparação de médias e teste qui-quadrado, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante a análise dos resultados, em relação ao número de UFCs presentes na cavidade oral dos cães, por meio da ANOVA, observou-se diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($p=0,004$). Comparando-se os grupos G0 (controle) e G1 (escovação dentária com solução fisiológica) não se verificou diferenças significativas, o que nos leva a crer que a simples escovação dos dentes sem a utilização de dentríficos não se mostra eficiente

na diminuição da quantidade de UFCs da cavidade oral dos cães. Quando comparados os grupos G0 e G2 e, G0 e G3, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas, demonstrando que a escovação dentária com a utilização do dentrífcio formulado com tiocianato de potássio, glicose oxidase, lactoperoxidase, sorbitol, benzoato de sódio, sílica hidratada, glicerina, dextrose, goma xantina, flavorizante, água purificada, sulfato bicálcico anidro, monofluorofosfato de sódio e dióxido de titânio (pasta dental A) foi eficiente redução das UFCs, assim como a escovação dentária com a pasta dental B, à base de polímero carboxílico e propilenoglicol. Quando foram comparados os grupos G1 e G2 e, G1 e G3, verificou-se diferenças estatísticas significativas, demonstrando que a escovação dentária utilizando-se a pasta dental A foi mais eficiente que a escovação com somente solução fisiológica, assim com a pasta dental B. Quando comparados os grupos G2 e G3, diferenças estatísticas significativas não foram observadas, sendo as duas pastas dentais eficientes na redução das UFCs. Estes resultados podem ser mais bem visualizados no gráfico 1.

Ao realizar-se uma nova comparação entre os grupos G1, G2 e G3 e analisando-se todos os tempos (T0, T1, T2, T3 e T4) ($p=0,0013$), verificou-se que a quantidade de UFCs entre os grupos G2 e G3, diferentemente do que havia sido verificado no primeiro teste, foi possível perceber que existe diferença estatística significativa entre estes dois grupos, tendo a pasta dental B se mostrado mais eficiente na redução do número de UFCs do que a pasta dental A, conforme pode ser observado no gráfico 2.

Para verificar a relação entre a alimentação dos animais e a espécie e/ou gênero de bactérias isoladas da cavidade oral utilizou-se o teste qui-quadrado, o qual permitiu verificar-se que os gêneros das bactérias isoladas dependem da alimentação fornecida ao animal ($p=0,0018$), como pode ser observado no gráfico 3. Neste último, também se pode verificar que as bactérias gram-positivas foram isoladas especialmente daqueles animais alimentados com uma dieta à base de ração e alimentação caseira e, as bactérias gram-negativas foram isoladas na sua maioria da cavidade oral de cães alimentados com ração seca. Uma possível explicação para isto esta relação de bactéria gram-negativa e ração pode ser o pH destas últimas. Ele pode alterar o microambiente da cavidade oral, propiciando um ambiente ideal para o crescimento das bactérias gram-negativas, uma vez que estas últimas são mais freqüentemente isoladas da cavidade oral de cães com doença periodontal (DORN, 1998; GREENE, 2003).

Conforme citado na literatura e constatado neste trabalho, a maior parte das bactérias isoladas da cavidade oral hígida dos animais foram gram-positivas, com um total de 59% em contrapartida com os 41% de gram-negativas. Este resultado já era esperado, visto que os animais utilizados neste projeto eram cães hígidos (DORN, 1998; GREENE, 2003). Com relação à espécie e gênero de bactérias, algumas das que foram isoladas dos animais, como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e a enterobactéria *Escherichia coli* estão de acordo com o citado na literatura (DORN, 1998; HIRSCH, 2003), porém outras bactérias como *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp., *Corynebacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Campilobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes faecalis* podem ser contaminantes ambientais, uma vez que muitos destes animais eram animais que vivem em fazendas e apenas uns poucos deles são animais de apartamento (HARVEY, et al., 2008).

Ao analisar-se a variação da quantidade de UFCs ao longo de 24 horas pós-escovação, por meio do método dos quadrados, verificou-se que a quantidade máxima de UFCs foi observada duas horas e nove minutos após a escovação. A partir disso, um declínio acentuado neste número foi observado, sendo a menor quantidade de UFCs detectada 16:30 minutos após a escovação, voltando a aumentar após este tempo (gráfico 4). Deste modo, a escovação dentária realizada a cada 12 horas se faz mais eficiente na redução do número das unidades formadoras de colônias (UFCs), discordando das três vezes semanais, recomendada na literatura. Este intervalo pode ser prolongado para a cada 24 horas para comodidade do proprietário.

CONCLUSÃO

A escovação dentária em cães somente é efetiva na redução do número de unidades formadoras de colônias quando utilizada com pastas dentais de cães; o gênero de bactérias isoladas depende do alimento fornecido aos animais; a flora bacteriana oral de cães hígidos é composta na maioria por bactérias gram-positivas e o intervalo de tempo ideal entre as escovações dentárias é de 12 horas, ou mesmo, a cada 24 horas.

REFERÊNCIAS

- DORN, A. S. Introdução para a Odontologia Veterinária. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1998. V2.
- EURIDES, D. et al. Placa bacteriana dentária em cães. **Ciência Rural**, v.26, n.3, p.419-422, 1996.
- GIOSO, M.A., CARVALHO, V.G.G. Métodos preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, ano IX, n. 52, p. 68 – 72, 2004.
- MURRAY, S., COX, E., LEPINE A. et al. Clinical Advancements in Nutritional Management of Oral Health. In: **28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association**. October 24-27, 2003. Bangkok – Thailand. Disponível em <<http://www.ivis.com>>. Acesso em: 10 outubro 2006.

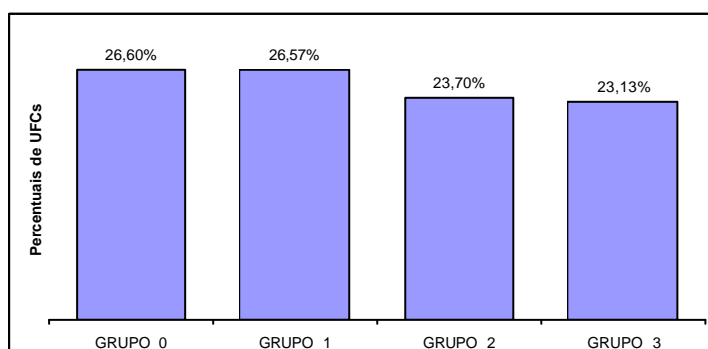


Gráfico 1: Percentual da média de UFCs em cada grupo estudado, relativos aos resultados obtidos no Teste de Tukey.

Fonte: CAOVILLA, T.; ROCHA, D. T. et al.

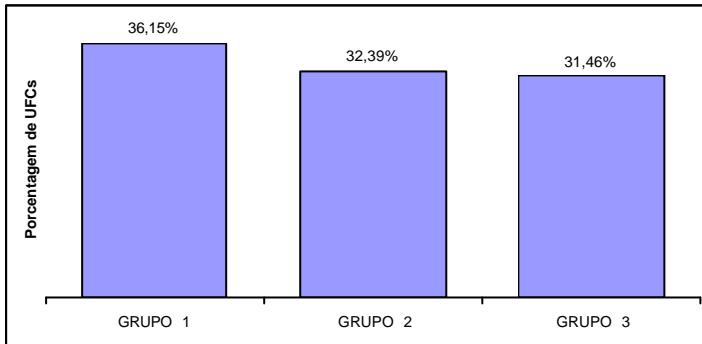


Gráfico 2: Percentual da média de UFCs nos grupos em que houve escovação dentária, relativos aos resultados obtidos no Teste de Tukey.

Fonte: CAOVIALLA, T.; ROCHA, D. T. et al.

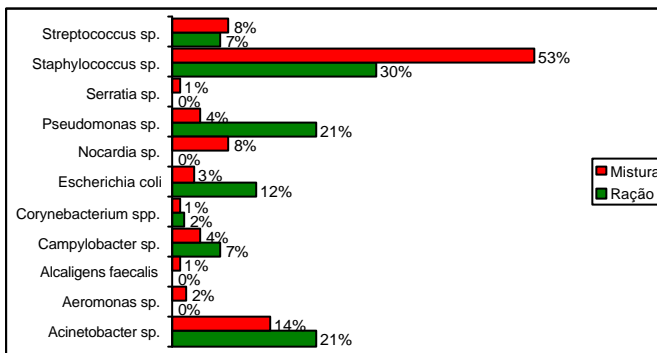


Gráfico 3: Bactérias isoladas em relação a alimentação fornecida.

Fonte: CAOVIALLA, T.; ROCHA, D. T. et al.

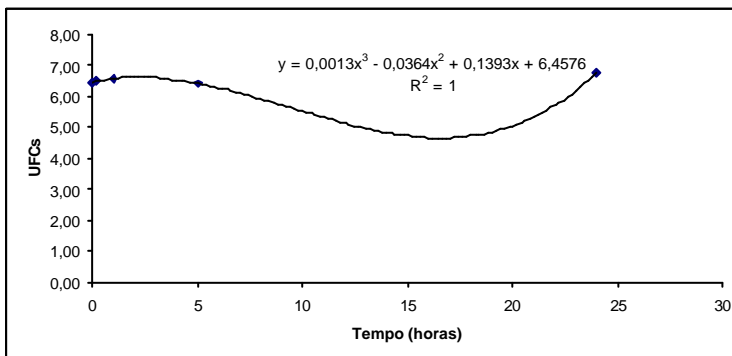


Gráfico 4: Variação da quantidade de UFCs ao longo de 24 horas.

Fonte: CAOVIALLA, T.; ROCHA, D. T. et al.