

Murilo de Sousa Guimarães

**“Contaminação
cruzada em escovas
dentais por
Streptococcus mutans”**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: **Prof.^a Dr.^a Angela Cristina Cilense Zuanon**

Co-Orientador: **Prof.^a Dr.^a Denise Madalena Palomari Spolidorio**

Araraquara

- 2005 -

Guimarães, Murilo de Sousa

Contaminação cruzada em escovas dentais por *Streptococcus mutans* / Murilo de Sousa Guimarães. – Araraquara : [s.n.], 2005.

149 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon

1. *Streptococcus mutans* 2. Contaminação 3. Creches
4. Escovas dentais I. Título.

Murilo de Sousa Guimarães

**“Contaminação cruzada em
escovas dentais por
Streptococcus mutans”**

COMISSÃO EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:	Prof. ^a Dr. ^a Ângela Cristina Cilense Zuanon
2º Examinador	Prof. ^a Dr. ^a Josimeri Hebling Costa
3º Examinador	Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Araraquara, 04 de março de 2005.

DADOS CURRICULARES

Murilo de Sousa Guimarães

NASCIMENTO 07.05.1979

FILIAÇÃO Armando Ribeiro Guimarães
Lúcia Maria de Sousa Guimarães

1999/2002 Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

2003/2004 Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológicas
(Concentração em Odontopediatria), nível de
Mestrado na Faculdade de Odontologia de Araraquara –
UNESP.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos meus pais **Armando Ribeiro Guimarães** e **Lúcia Maria de Sousa Guimarães**. Aqueles que me possibilitaram a vida, o desenvolvimento, a formação, o equilíbrio e o permanente estado de felicidade interna, apesar das adversidades que possam aparecer. Obrigado pela escola, obrigado pelo exemplo, obrigado pelos pilares.

Aos meus queridos irmãos, **Frederico** e **Fabiane**. Aqueles que me apoiaram e que foram companheiros e amigos durante toda minha jornada.

Ao meu filho **Felipe**, que foi sempre fonte de alegria nas horas difíceis.

Agradecimentos Especiais

Ao **Prof. Dr. João Aristeu da Rosa**. Magnitude e simplicidade em um só indivíduo. Grato pela acolhida e arranque inicial em minha vida de pesquisador.

À **Prof.^a Dr.^a Ângela Cristina Cilense Zuanon**, pela amizade, paciência, contribuição preciosa à minha formação profissional e que motiva-me a seguir o caminho escolhido. Meu eterno carinho.

Ao Sr. **José Antônio Sampáio Zuanon** pela amizade, que me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal.

À **Prof.^a Dr.^a Denise Madalena Palomari Spolidorio**, sempre presente, conselheira e amiga, que prontamente assumiu a co-orientação desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu querido amigo **Luciano Elias da Cruz Perez**, companheiro de vestibular, Graduação e Pós-Graduação, e de todas as lutas travadas em conjunto.

À **Érika Botelho Josgrilberg**, pelo carinho, apoio e por me fazer ainda mais feliz, mantendo aquele meu sorriso interior.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), na pessoa do Digníssimo Reitor **Prof. Dr. Marcos Macari**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, na pessoa da Digníssima Diretora **Prof.^a Dr.^a Rosemary Adriana Chiérnici Marcantonio** e do Digníssimo Vice-Diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos os **professores do Curso de Pós-Graduação**, pela experiência e ensinamentos transmitidos.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria: **Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Prof.^a Dr.^a Ângela Cristina Cilense Zuanon, Prof.^a Dr.^a Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Loyola Cordeiro** pelos importantes ensinamentos, e principalmente, pela amizade e dedicação recebidas.

Às professoras **Prof.^a Dr.^a Elisa Maria Aparecida Giro e Prof.^a Dr.^a Josimeri Hebling Costa**, pela dedicação, paciência e experiência importantes para minha formação, e pela amizade, essencial nesta minha trajetória.

Ao **Prof. José Silvio Govone** da Unesp de Rio Claro, pela incomparável disponibilidade e simplicidade com que me trata, pela paciência e atenção mesmo fora do horário de trabalho, para passar seus conhecimentos de Bioestatística, tirar dúvidas e conferir as análises.

Aos amigos e colegas de curso **Pedro Paulo Chaves de Souza, Júnia Carolina Ferrari, Fabíola Galbiatti Carvalho, Mariane Emi Sanabe, Hermes Pretel, Fábio Scanavinno, Jonas de Almeida Rodrigues, Thiago Mello Menezes** (in memorian), **Cris Duque, Cris Motsuki, Renata, Juliana, Luciana, Juçaíra, Célia, Andreza e Ticiano**.

Aos estagiários da emergência em odontopediatria **Michele, Nancy, Patrícia, Andréa, Fabiano**.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, que me acolheram e me ajudaram em vários momentos, que todos recebam meus sinceros agradecimentos – **Silvia, Dulce, Tânia, Dona Odete, Célia, Sônia, Toninho, Pedrinho, Edinho** (in memorian), **Regina, Bel e Cris**.

À seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: **Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosângela Aparecida Silva dos Santos, Silvia Regina Rodrigues Soares de Azevedo e José Alexandre Garcia.**

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP: **Maria Helena Matsumoto Komatsi Leves, Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, Marley Cristina Chiusoli Montagnoli, Eliane Cristina Marques de Mendonça Spera, Maria Aparecida Capela Carvalho, Odete Aparecida Camilo, Adriano Ferreira Luiz, Eliane Maria Sanches Scarso, Maria Inês Carlos e Silvia Helena Acquarone Lavras,** pelo empenho sempre acompanhado de um sorriso.

À coordenadora técnica de Educação Infantil do Município de Araraquara Sra. **Julia Pimenta** e a diretora Sra. **Déborah Miltis Sampaio Azzolino Macias** da Creche Municipal Vale do Sol Ricardo Castro, que permitiram a realização deste estudo.

Aos **pais das crianças** que consentiram e contribuíram com a pesquisa.

Às **crianças** que possibilitaram a realização deste trabalho.

A **todos** que colaboraram, de alguma forma, com a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

Introdução.....	10
Revisão da Literatura.....	15
Proposição.....	68
Material e Método.....	70
1 Seleção dos voluntários.....	71
2 Coleta de dados.....	72
3 Coleta das amostras.....	73
4 Processamento do material coletado.....	73
5 Identificação das espécies de <i>Streptococcus grupo mutans</i>	74
5.1.Morfologia colonial.....	74
6 Identificação bioquímica.....	76
6.1 Fermentação de carboidratos.....	76
6.2 Hidrólise de Arginina.....	78
6.3 Produção de Peróxido de Hidrogênio.....	78
6.4 Resistência a Bacitracina.....	79
7 Conservação das cepas.....	80
8 Identificação genética por AP-PCR.....	80
8.1 Extração do DNA.....	80
8.2 Padronização das condições de amplificação.....	81
8.3 Análise numérica dos perfis eletroforéticos	84
Resultados.....	86
Discussão.....	97
Conclusão.....	109
Referências Bibliográficas.....	111
Resumo.....	132
Abstract.....	135
Anexos.....	138

INTRODUÇÃO

A cárie dental, apesar de apresentar significativo declínio em algumas populações, continua sendo um importante problema de saúde pública. É conceituada como uma doença infecciosa, de origem bacteriana, transmissível entre humanos e decorrente da interação de vários fatores, resultando na perda de estruturas mineralizadas do elemento dental^{40,62,73,79,85,94,100}.

A participação de microrganismos nas doenças da cavidade bucal tem sido descrita há muito tempo, sendo que aqueles relacionados à lesão de cárie são representados principalmente pelos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, especialmente em se tratando dos estágios iniciais da doença^{13,37,40,42,51,61,62,64,71,73,75,79,85,93,94,101,103}.

A prevenção da cárie dental e a manutenção das estruturas periodontais saudáveis são possíveis por meio da eliminação, redução ou desorganização do biofilme bacteriano, com a ajuda de alguns recursos, dentre os quais pode-se destacar os mecânicos, representados pela escovação e uso de fio dental^{11,12,22,80,95}.

Sem dúvida a escovação dental é a forma de higiene bucal mais amplamente utilizada e socialmente aceita, constituindo um dos componentes básicos dos programas de prevenção para promoção da saúde bucal. Porém, estudos epidemiológicos têm demonstrado que grande parte da população desconhece a correta forma de higienização e o seu valor para a saúde bucal^{3,11,12,31,80}. A instituição de programas de instrução de higiene bucal, por meio do uso de escova e fio dental,

pode levar ao controle do biofilme bacteriano e melhoras significativas na saúde bucal^{12,22,99}.

Além de abordar a importância da correta escovação para a manutenção da integridade dos tecidos da cavidade bucal, os programas deveriam incluir também os cuidados com a escova dental, como sua correta limpeza e armazenamento. Estudos recentes demonstram a necessidade de desinfecção das escovas dentais, já que suas cerdas podem ser contaminadas por vírus, fungos e principalmente bactérias cariogênicas^{10,27,54,60,71,87,91}.

O hábito incorreto da escovação dental e da forma de acondicionamento das escovas, pode se tornar fonte de transmissão de inúmeras doenças^{17,60}. Brandão et al.¹⁷ (2001) avaliaram as formas de acondicionamento das escovas dentais em creches municipais do Rio de Janeiro e observaram que 46% delas permaneciam em contato direto entre si e que 73% foram acondicionadas descobertas. Concluíram que não existe padronização nas formas de acondicionamento, sugerindo a normatização das ações de higienização bucal e implantação de programas de motivação e capacitação educativo e preventivo.

Preocupados com a contaminação de escovas dentais por bactérias cariogênicas, Macari et al.⁶⁰ (2001) estudaram o desenvolvimento de *Streptococcus* do grupo *mutans* nas cerdas das escovas e métodos para desinfecção-las. Após imergí-las em água de torneira esterilizada, solução de gluconato de clorexidina 0,12%, ou solução de hipoclorito de sódio a 1%, encontraram a presença desses microrganismos apenas nas cerdas das escovas que foram imersas em água de torneira, comprovando

a ineficácia desta forma de desinfecção e possibilidade de contaminação cruzada. De acordo com Soares et al.⁸⁷ em 2004, as escovas dentais podem ser infectadas por *Streptococcus* grupo *mutans* após seu uso, tornando-se vias de contaminação inter-individual.

Com o objetivo de identificar e caracterizar esses microrganismos, assim como seu modo de transmissão, técnicas de Biologia Molecular, como a de AP-PCR (“Arbitrarily Primed - Polymerase Chain Reaction”), vêm inovando os estudos referentes a identificação de *Streptococcus mutans*. É aceito que a metodologia de AP-PCR promove maior sensibilidade na detecção de espécies bacterianas, quando comparadas com técnicas de cultura convencionais^{56,90}. Assim, o AP-PCR está sendo considerado um substituto para detecção específica e identificação de bactérias cariogênicas humanas, como o *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*^{26,35,46,47,48,56,63,67,78,90}.

O sequenciamento genético do *Streptococcus mutans*, juntamente com estudos de modelos de biofilme dental, sistema de adesão e acidogenicidade bacteriana, promovem investigações importantes sobre as bases moleculares da cárie dental, os quais podem resultar em novos protocolos preventivos e tratamentos para redução da incidência desta doença⁹.

Estudos com DNA (“desoxirribonucleic acid”) por meio de AP-PCR demonstram que a transmissão vertical de mãe para filho é a principal forma de aquisição precoce de microrganismos^{48,90}. Porém, a detecção de linhagens em crianças não presentes em suas mães ou em outros membros da família, indica que o

Streptococcus mutans também pode ser adquirido de outras formas^{6,7,20,52,63,76,77,88,90}. Mattos-Graner et al.⁶³ (2001) e Okada et al.⁷¹ (2002) encontraram diferentes linhagens desses microrganismos em crianças, as quais estavam ausentes em seus pais.

Sabe-se que se medidas preventivas forem tomadas para impedir ou retardar a colonização por *Streptococcus mutans*, a experiência de cárie pode ser reduzida tanto na dentição decídua quanto na dentição permanente^{2,18,25,50,51,95,103}. Deve-se lembrar também que o tratamento da cárie é dispendioso, muitas vezes invasivo e demorado.

Uma vez que as escovas dentais podem servir como reservatório, fonte de inoculação e re-introdução de microrganismos na cavidade bucal, há necessidade do desenvolvimento de protocolos para seu correto armazenamento e descontaminação, assim como instruções sobre sua contaminação por *Streptococcus mutans* e as vias de transmissão desses microrganismos.

REVISÃO DA LITERATURA

Para avaliar a relação entre a concentração de bactérias na saliva e na superfície dental, van Houte e Green¹⁰⁰ em 1974, coletaram amostras de saliva e biofilme dental de doze voluntários adultos com experiência de cárie, os quais bochecharam por 15 minutos, uma solução diluída contendo *Streptococcus sanguis*. Os resultados mostraram que o número de bactérias encontradas na cavidade bucal foi proporcional à concentração da solução dos bochechos. *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* estavam em maior número nas superfícies dentais do que na saliva. Após 2 e 3 horas de profilaxia, as concentrações desses microrganismos diminuíram, não sendo possível isolá-los a partir do biofilme dental. Os autores citaram também que alguns fatores devem ser observados na regulação da microbiota bucal, como a afinidade das bactérias por superfícies bucais, número de células viáveis para adesão, multiplicação bacteriana, frequência de transmissão, tempo hábil de transmissão para a aderência das bactérias, sobrevivência durante a transmissão e outros fatores que podem influenciar na aderência e crescimento dos microrganismos.

Berkowitz et al.¹⁶ em 1975, estudaram a colonização por *Streptococcus mutans* em crianças, com idade variando de 3 semanas a 14 meses. Foram identificadas por testes sorológicos, 66 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus mutans* de nove pares de mãe/filho. Não foi encontrado *Streptococcus mutans* nas crianças edêntulas, sendo identificado apenas em

algumas fissuradas e que utilizavam placa acrílica palatina. As mães foram identificadas como portadoras do sorotipo B, C, D e E, enquanto que as crianças apresentaram apenas o sorotipo C. Considerando que em um par de mãe-filho foi observado o sorotipo b e que a mãe morava sozinha com a criança, os autores sugeriram a transferência maternal desses microrganismos.

A correlação existente entre o número de *Streptococcus mutans* na saliva dos pais e seus filhos, e a transmissão desses microrganismos por meio de objetos contaminados por saliva, foram estudadas por Kohler e Bratthall⁴⁹, em 1978. Foi encontrada correlação quantitativa entre os níveis salivares destas bactérias nos pais e em seus filhos, com evidência maior para a relação mãe/filho. A análise bacteriológica de mesas, maçanetas, telefones, entre outros, resultou em contaminação por colônias de *Streptococcus mutans*. Relação quantitativa também foi observada nos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e nos níveis de microrganismos encontrados nos objetos. Para os autores, se a mãe ou a pessoa que cuida da criança apresentar menos que 100.000 UFC *Streptococcus mutans*/ml de saliva, representará baixo risco de infectar a criança por meio de objetos contaminados.

As características que tornam os *Streptococcus* grupo *mutans* os microrganismos mais importantes no desenvolvimento da cárie humana, foram estudados por Hamada e Slade³⁷, em 1980. Os autores relataram que seu principal habitat natural é a boca humana, colonizam principalmente as superfícies dentais e

aparelhos protéticos intra-bucais, têm seu potencial cariogênico influenciado por fatores dietéticos (sacarose), e seus níveis percentuais estão fortemente associados com a cárie.

Estudando a presença de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças, assim como de seus pais, van Houte et al.¹⁰¹ em 1981, observaram que a frequência de isolados em crianças cárie ativas foi maior do que em crianças livres de cárie. Os pais e as mães de crianças com cárie também apresentaram alta frequência de isolamento. Os autores concluíram que a etiologia da cárie dental é o *Streptococcus mutans* e sugeriram tendência familiar de infecção por este microrganismo.

Kohler et al.⁵⁰ em 1983, estudaram 28 mães e seus filhos, divididos em um grupo experimental, onde as mães foram educadas quanto aos hábitos alimentares e de higiene bucal, receberam aplicações tópicas de flúor, profilaxia e escavação em massa, enquanto o segundo grupo foi avaliado apenas como controle. Amostras de saliva e biofilme para detecção de *Streptococcus mutans* foram coletadas periodicamente, desde o nascimento até as crianças completarem 36 meses de idade. Nos dois grupos, a porcentagem de infecção pelo microrganismo aumentou de acordo com a idade das crianças, sendo encontrado, no grupo experimental, 11% de contaminação de crianças até os 23 meses de idade, e 19% até os 36 meses. No grupo controle, 45% das crianças apresentaram contaminação por *Streptococcus mutans* até os 36 meses de idade. Os autores concluíram que a

transmissão de *Streptococcus mutans* pode ser diminuída ou controlada por meio da aplicação de medidas direcionadas a fonte de infecção, ou seja, as mães.

Davey e Rogers²⁴ em 1984, estudaram a transmissão intra-familiar de *Streptococcus mutans*, coletando saliva e biofilme dental de cada membro de 10 famílias. As amostras foram cultivadas em meio SB20 e identificadas bioquimicamente e por bacteriocinotipagem. Foram realizadas duas coletas com espaço de seis meses entre as mesmas. Os autores encontraram os mesmos sorotipos salivares nas duas coletas, e observaram que a maioria dos pais não compartilhava os mesmos sorotipos com os outros membros da família. Todas as crianças infectadas porém, compartilhavam no mínimo um sorotipo comum às amostras de suas mães. Desta forma os autores concluíram que as mães representam a principal fonte de transmissão de *Streptococcus mutans* para seus filhos.

A amostra de *Streptococcus mutans* denominada JH1001, extraída de um adulto livre da doença cárie, produz uma bacteriocina capaz de matar todas as outras amostras desse microrganismo em laboratório, e se apresenta menos agressiva em relação a doença cárie. Com esse conhecimento, Hillman et al.⁴¹ em 1985, testaram a habilidade deste microrganismo em colonizar a cavidade bucal de cinco voluntários. Após dois anos e meio de acompanhamento, três voluntários mostraram-se ainda colonizados pela bactéria, sendo que os níveis totais de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* indígenas não foram afetados. As

bactérias indígenas de apenas um dos participantes reduziram-se a níveis não detectáveis. Os autores concluíram que são necessários mais estudos visando utilizar a terapia de substituição de bactérias indígenas, para prevenção da cárie dental.

Altas contagens de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças podem representar o indício de risco ao desenvolvimento da doença cárie. Desta forma, Brown et al.¹⁸ em 1985, estudaram a relação existente entre a contagem dessas bactérias na saliva de mães, crianças livres de cárie e acometidas por cárie de mamadeira. Os resultados foram divididos em baixo (0 – 20 UFC), médio (21 – 100 UFC) e alto (> 100 UFC) para contagem de bactérias. Os autores encontraram forte associação entre os escores das mães e dos filhos e concluíram que quanto mais alta a contagem de microrganismos na saliva das mães, mais chances a criança possui de ser infectada. Desta forma programas de prevenções devem ser realizados para prevenir lesões de cárie, considerando entre outros fatores, a contagem de *Streptococcus mutans* das mães e de seus filhos.

Berkowitz e Jones¹⁵ em 1985, distinguiram 41 tipos diferentes de bacteriocinas de isolados de *Streptococcus mutans* de 20 pares mãe-filho. Amostras de biofilme dental foram coletadas das crianças (10 a 16 meses de idade), enquanto amostras de saliva foram coletadas das mães. As amostras foram identificadas por testes bioquímicos e a produção de bacteriocinas por meio de testes de halo de inibição. Os autores observaram que grande parte das mães eram

portadoras de múltiplos tipos de bacteriocinas, enquanto que as crianças mostraram apenas um tipo. Notaram também que a maioria dos isolados de *Streptococcus mutans* de cada par, possuíam códigos genéticos idênticos, reforçando o conceito da transmissão dessas bactérias de mãe para filho.

Analisando amostras de saliva de 78 crianças de quatro anos de idade, Kohler et al.⁵¹, em 1988 estudaram a relação entre a aquisição precoce de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus spp.* com a incidência de lesões de cárie. Foram coletadas amostras de saliva a partir do 15º mês de vida até o 4º ano de idade, assim como foram feitos exames clínicos para a observação da possível presença de lesão de cárie. As culturas foram realizadas em meio MSB, e a identificação das bactérias, por imunofluorescência. Os resultados demonstraram que quanto mais cedo as crianças adquiriram os microrganismos, mais precocemente se instalou a doença. Na maioria das crianças foram encontradas as duas espécies de *Streptococcus* grupo *mutans*, sendo que aquelas que possuíam alta prevalência à cárie foram portadores apenas *Streptococcus mutans*. Desta forma os autores puderam concluir que as crianças que adquiriram precocemente *Streptococcus mutans* possuíam alto risco para o desenvolvimento de lesões de cárie, justificando medidas de prevenção por meio de análises microbiológicas em idade precoce.

Por meio de análise de amostras de saliva de 50 pares mãe-filho, com idade variando de 24 a 51 anos e 3 a 12 anos respectivamente, Azevedo⁶ em 1988,

verificou que 31 dos filhos apresentaram o(s) mesmo(s) subtipo(s) de *Streptococcus mutans* que suas mães. Foi observado também que 29 filhos e 26 mães estavam monocolonizados pela espécie predominante, *Streptococcus mutans*. No que diz respeito à multicolonização, podê-se constatar que 15 filhos e 24 mães estavam infectados pelas espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Os autores não apontaram a mãe como a única e/ou principal fonte dos microrganismos, pois considerando a faixa etária das crianças, estas tiveram a oportunidade de se relacionarem com diferentes tipos de pessoas.

Alaluusua et al.³, em 1989 encontraram clara associação entre concentração elevada de *Streptococcus mutans* na saliva e a experiência de cárie de 149 crianças de 5 anos de idade, que haviam participado de um programa, o qual transmitiu informações sobre nutrição e saúde e tratamentos odontológicos preventivos e restaurativos. Foram encontradas UFC de *Streptococcus mutans* apenas em 46% das amostras, o que pode ser justificado pela microbiota bucal ainda estar em desenvolvimento e pelo programa oferecido. O biofilme dental também foi analisado em 47 crianças, quando os autores observaram que o número de superfícies contaminadas aumentou com o aumento da concentração de *Streptococcus mutans* na saliva.

Por meio de revisão de literatura Alaluusua² em 1991, observou que diversos estudos concluíram que em crianças de pouca idade infectadas precocemente, ocorre o estabelecimento de *Streptococcus mutans* na cavidade

bucal e aumenta o risco do desenvolvimento da lesão de cárie. Relatou que a principal fonte de transmissão é representada pelas mães e medidas preventivas devem ser criadas para diminuir seus níveis de *Streptococcus mutans*, tentando retardar a colonização de seus filhos. De acordo com o autor, informações devem ser transmitidas aos pais quanto as rotas de transmissão, consumo de açúcar, e prevenção.

A prevalência de cárie, quantidade e distribuição de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram avaliados duas vezes durante um ano, em 356 crianças japonesas, de 0 a 2 anos de idade. O estudo foi realizado por meio de exames clínicos e amostras de saliva, semeadas em meio MSB, e identificadas por meio de testes bioquímicos. Desta maneira, Fujiwara et al.³² em 1991, observaram que a presença de *Streptococcus mutans* e a prevalência de cárie aumentaram com a idade das crianças e o número de dentes erupcionados, não sendo encontrado o microrganismo em crianças edêntulas. Os autores notaram também que após 1 ano de estudo, as crianças que inicialmente não apresentavam lesões de cárie e eram portadores de *Streptococcus mutans*, apresentavam maior prevalência de lesões do que as crianças que não possuíam cárie e nem o microrganismo.

A prevalência e distribuição de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram determinadas por meio de coleta de amostra de biofilme dental, dorso da língua, superfícies proximais e de fissuras oclusais de 40 indivíduos. Lindquist e Emilson⁵⁷ em 1991, cultivaram estas amostras em meio MSB e as

identificaram por testes bioquímicos. Observaram que a maior concentração de bactérias habitava a superfície oclusal dos molares, sendo representadas principalmente por *Streptococcus sobrinus*. Embora a maioria dos sítios estudados albergavam as duas espécies indicando associação positiva entre as mesmas, quando considerados todos os sítios analisados, a presença de *Streptococcus mutans* foi maior do que de *Streptococcus sobrinus*.

Utilizando um protocolo de fermentação e testes enzimáticos, Beighton et al.¹⁴ em 1991, compararam amostras já identificadas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, para estabelecer um esquema simplificado para diferenciação bacteriana isolada á partir de um meio seletivo. Os autores utilizaram 170 amostras de *Streptococcus mutans* e 30 de *Streptococcus sobrinus* isoladas em meio MSB, as quais foram utilizadas para testes de habilidade em fermentar arbutina, amigdalina, inulina, glicose, lactose, manitol, melibiose, N – acetilglucosamina, rafinose e sorbitol, hidrolisar esculina e produzir amônia por arginina. A produção de enzimas foi observada por meio da produção de α – D – galactosidase, α – D – glucosidade e β - D – glucosidase. Desta forma os autores montaram uma tabela, diferenciando as duas bactérias, e sugerindo esta nova forma de diferenciação das mesmas, a qual se apresenta mais barata e sem a necessidade de reagentes e aparatos especializados.

A microbiota bucal é altamente complexa, contendo grande variedade de espécies bacterianas, vírus e fungos. As doenças bucais mais comuns são a cárie

dental e a doença periodontal, as quais estão relacionadas ao biofilme dental e distúrbios entre microrganismos e hospedeiro. Desta forma, Hardie⁴⁰ em 1992, em sua revisão de literatura sobre a microbiologia da cárie dental e doença periodontal, abordou aspectos relacionados as teorias sobre etiologia da cárie e doença periodontal, bactérias cariogênicas em animais e humanos, risco a cárie, prevenção de lesões, e o desenvolvimento das pesquisas sobre doença periodontal. O autor concluiu que os modernos métodos moleculares de estudo de bactérias poderão esclarecer as propriedades e interações das mesmas, auxiliando clinicamente o tratamento e novas formas de diagnóstico.

A análise qualitativa e quantitativa da microbiota bucal pode contribuir para a avaliação do risco ao desenvolvimento da cárie. Azevedo et al.⁸ em 1993, determinaram o número de UFC de *Streptococcus* grupo *mutans* e a prevalência de suas espécies na saliva de 193 crianças. Observaram que das crianças analisadas, 30,6% apresentaram baixo risco a cárie, 30,0 % médio e 39,4% alto risco a cárie. Mais da metade das crianças (52,9%) estavam multi-colonizadas pelas espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

De acordo com Caufield et al.²⁰ em 1993, a aquisição inicial de *Streptococcus mutans* por bebês ocorre na faixa etária entre 19 e 31 meses de idade, denominada de “janela de infectividade”. Os autores monitoraram 46 pares de mães e bebês, do nascimento até os cinco anos de idade, selecionados com os altos níveis de *Streptococcus mutans* presentes na saliva das mães. Observaram

que as crianças que não foram colonizadas por cepas encontradas em suas mães, eram assistidas por babás.

Por meio de um estudo clínico randomizado, duplo cego, procurando avaliar a transmissão de *Streptococcus mutans* de mães para filhos, seis aplicações de I₂-Naf (grupo experimental) e solução placebo (grupo controle) foram realizadas em mães no momento em que os dentes decíduos de seus filhos erupcionavam. Uma aplicação de I₂-Naf por mês em cada mãe foi realizada por Dasanayake et al.²³ em 1993, durante os seis meses após o parto. Foram realizadas coletas de saliva das 48 mães e de seus filhos até os três anos de idade, e a análise microbiológica foi realizada para quantificação e identificação de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* Os autores observaram que houve diminuição de todos os microrganismos cultivados após o tratamento. Não houve diferença estatística entre os dois grupos em relação a colonização, tempo de aquisição de *Streptococcus mutans*, e experiência a cárie. Os autores concluíram que o tratamento diminuiu significativamente a quantidade de microrganismos, porém não influenciou na incidência e período de aquisição dos mesmos.

Com o objetivo de determinar a possível similaridade do padrão bacteriogênico intrafamiliar, Azevedo e Zelante⁷, em 1994, selecionaram 22 famílias compostas de mãe, pai e dois filhos, sendo uma criança edêndula, a qual permitiu coleta de amostras de saliva e biofilme dental antes e após a erupção do primeiro dente. Foram identificados 397 UFC de *Streptococcus mutans*, porém

apenas 95 produziam mutacinas, sendo 55 delas relacionados com *Streptococcus mutans*, 15 com *Streptococcus rattus*, 21 com *Streptococcus cricetus*, 3 relacionada com *Streptococcus sobrinus* e 1 com *Streptococcus ferus*. A constante similaridade encontrada de padrões bacteriocinogénicos detectados, provou a ocorrência de transmissão intrafamiliar dessas bactérias. As mães não foram consideradas a única fonte de transmissão, pois foram detectados modelos bacteriocinogénicos similares na cavidade bucal entre outros membros da família.

A influência da rotina desenvolvida pelas creches sobre os padrões de saúde bucal de crianças em idade pré-escolar, foi estudada por Tomita et al.⁹⁹ em 1994. Os autores realizaram avaliação da história de cárie em crianças de duas creches. Uma creche incluía uma rotina institucional, a qual contemplava cuidados sistematizados de saúde sob orientação psico-pedagógica, e outra, a qual oferecia nenhuma rotina de cuidados de saúde. Os autores observaram melhores condições de saúde bucal na instituição que promovia cuidados à saúde, sugerindo que a escola constitui um pólo de extensão de cuidados à criança e à família.

Por meio de um estudo realizado com 55 crianças de sete meses de idade, e realizado durante sete anos, Aaltonen e Tenovuo¹ em 1994, estudaram a frequência de contatos salivares entre mãe e filho, como fator influente na resposta imune das crianças contra *Streptococcus mutans*. A amostra foi dividida em dois grupos: mães com contatos frequentes e mães com raros contatos com

seus filhos. Foi observada baixa concentração de *Streptococcus mutans* na saliva e menor número de lesões de cárie em crianças que mantinham contatos freqüentes com suas mães. Não houve diferenças significantes entre os dois grupos experimentais em relação ao risco de cárie materno, *Streptococcus mutans* na saliva materna, e fatores como hábitos alimentares, educação e idade da criança. Os autores concluíram que não existe associação na infecção e transferência de bactérias da saliva materna para a criança, assim como o desenvolvimento de cáries na dentição decídua, provavelmente devido a mecanismos de proteção imunológica da criança.

Avaliando-se pesquisas relativas à transmissibilidade da microbiota bucal em humanos, Duarte et al.²⁵ (1995), realizaram revisão de literatura sobre transmissibilidade de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Streptococcus mutans*. Os autores concluíram que não existe um recurso clínico capaz de controlar ou prevenir com eficácia a transmissibilidade da microbiota bucal entre humanos. Relataram também que o fato dos microrganismos não desencadearem necessariamente a lesão de cárie ou a doença periodontal, os pais portadores de microbiota bucal evidentemente patogênica devem ser aconselhados em relação aos cuidados para evitar a transmissão desses microrganismos aos seus filhos.

Li e Caufield⁵⁵ em 1995, monitoraram 34 pares de mãe-filho desde o nascimento até 3 anos de idade da criança, com intervalos de aproximadamente 3 meses. Após a realização da genotipagem por meio de análise de DNA

fingerprinting, os autores encontraram em 71% dos pares mãe-filho, genótipos de *Streptococcus mutans* idênticos. Oito das onze crianças (73%) que apresentaram experiência de cárie, continham o mesmo genótipo encontrado em suas mães. Assim os autores concluíram que a homologia de genótipos entre mães e filhos a partir da colonização inicial sugere fortemente que as cepas desses microrganismos foram transmitidas pelas mães aos seus filhos.

Buscando correlacionar as variáveis sociais e sua influência sobre a ocorrência de cárie em crianças de 0 a 6 anos de idade, Tomita et al.⁹⁸ em 1996, avaliaram por meio de questionários e índice ceos, crianças de creches de São Paulo e Bauru. Observaram que a prevalência de cárie foi maior na faixa etária de 3-4 e 5-6 anos, e que a frequência de consultas odontológicas foram fatores influentes sobre a prevalência de cárie. Os autores observaram também que crianças que já haviam recebido atendimento odontológico, mostraram tendência a aumento no índice de cárie.

Analisando a prevalência de *Streptococcus* grupo *mutans*, por meio de amostras de saliva de 104 crianças, com faixa etária de 5 a 14 anos de idade, Nelson Filho et al.⁶⁸ em 1996, observaram que os *Streptococcus* grupo *mutans* foram encontrados em todas as amostras. Dos indivíduos observados, 74% foram portadores de uma única espécie, sendo que 68,2% possuíam *Streptococcus mutans*, 3,8% com *Streptococcus rattus* e apenas 1% com *Streptococcus sobrinus* e 1 % *Streptococcus cricetus*. Os autores concordaram que a diversidade na

freqüência de isolamento de diferentes espécies do grupo *mutans* se referiram à possível interferência de variações geográficas e metodologia adotada.

Examinando amostras de saliva por ribotipagem, em crianças de 1 a 3 anos de idade, e suas respectivas mães, Alaluusua et al.⁴ em 1996, observaram por meio da coleta de biofilme bacteriano das crianças e saliva estimulada das mães, que as crianças com cárie possuíam dieta rica em açúcar, alta contagem de colônias de *Streptococcus mutans*, e 66,7% destas apresentavam mais de um ribotipo diferente. Nas crianças livres de cárie, a contagem de colônias foi menor e apenas 16,7% apresentavam mais de um ribotipo diferente. As mães também apresentaram resultados semelhantes, ou seja, as que tinham filhos com cárie possuíam altas contagens de colônias e maiores quantidades de ribotipos diferentes. Desta forma, os autores concordaram que as mães representam a principal fonte de transmissão dos microrganismos para seus filhos.

Por meio de um levantamento epidemiológico em 54 creches públicas e privadas de Goiânia (GO), Freire e Melo³¹ (1996), investigaram fatores institucionais que poderiam intervir no estado de saúde bucal de 2.267 crianças de 0 a 6 anos de idade. Foram coletados dados por meio de entrevista realizada com os responsáveis pelas crianças referentes aos hábitos diários das mesmas. Foram também coletadas informações referentes às instituições sobre a existência de água fluoretada, uso de açúcar nas refeições, práticas de higiene bucal desenvolvidas nas instituições, bem como acesso à assistência odontológica

integral. Os resultados demonstram que 98% das creches possuíam água fluoretada, 91% realizavam escovação diária e que todas utilizavam açúcar na alimentação das crianças. Apenas 22,4% das creches públicas contavam com assistência odontológica. Os dados sugeriram que a situação de cárie encontrada nas creches deve-se muito mais aos condicionantes dentro de seus lares. De acordo com os autores, o tempo que as crianças permanecem na instituição é curto, a ingestão de açúcar em casa é maior, existe um baixo acesso aos fluoretos presentes na água de abastecimento de suas residências, bem como o nível de informação sobre saúde bucal dos pais apresentou-se baixo. Desta forma os autores concluíram que há a necessidade de se estabelecer programas de promoção de saúde bucal à população de baixa renda que sejam adequados à realidade em que vivem.

Garnier et al.³⁴ em 1997, desenvolveram um novo protocolo para a utilização da técnica de PCR, a qual identificava espécies de *Streptococcus* grupo *viridans* como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, e algumas espécies de *Streptococcus* grupo *milleri*. Os autores utilizaram amostras de microrganismos preparadas em laboratório e a técnica do PCR (“Polymerase Chain Reaction”) para confirmação. Todas as amostras estudadas foram confirmadas, com exceção das amostras de *Streptococcus vestibularis*, as quais foram identificadas como *Streptococcus salivarius*. Os autores mostraram que por meio deste novo protocolo, o PCR é uma técnica rápida (48 horas após o

isolamento) e específica para identificação clínica de relevantes espécies de estreptococos, quando comparada a identificação fenotípica ou hibridização de DNA-DNA.

Em um estudo prospectivo e longitudinal, Battelino et al.¹² (1997), estudaram a participação de fatores de risco no aparecimento de lesões de cáries em pré-escolares de diferentes condições sócio-econômicas, de creches da cidade de Córdoba, Argentina. Foram selecionadas 850 crianças, entre 4 e 5 anos de idade, as quais foram divididas em grupos de acordo com o nível sócio-econômico. Foram realizados exames clínicos, testes bioquímicos e imunológicos, e aplicado questionário sobre consumo de açúcares e tratamento preventivo. Pôde-se observar que nas creches onde foi oferecida a aplicação de medidas preventivas como a educação para redução de ingestão de açúcares, escovação assistida e aplicações tópicas de flúor, resultou em um controle eficaz da cárie, principalmente em crianças de condição sócio-econômica menor, onde realmente se concentra a doença.

Por meio de revisão de literatura, Slavkin⁸⁴ em 1997, correlacionou a microbiota bucal, transferência de imunidade dos pais aos filhos e a multiplicação de bactérias bucais em crianças. O autor observou que as pesquisas mostraram que na cavidade bucal existe maior número de bactérias que de pessoas no mundo, e que a transmissão ocorre intra-familiar. Observou também que o crescimento do número de bactérias pode ser controlado pelos próprios anticorpos das crianças,

transmitidos pela mãe através da amamentação. O autor afirmou ainda que os estudos recentes sobre a transmissão de microrganismos bucais frisam a necessidade de contatos próximos e duradouros entre mãe e filho (quantidade e qualidade).

Sete famílias com dois filhos, sendo o mais novo portador de cárie de mamadeira, e o mais velho, sem cárie de mamadeira, foram estudadas por Kreulen et al.⁵³ em 1997. Os autores procuraram relacionar a microbiota de crianças com cárie de mamadeira e de seus irmãos sem cárie de mamadeira, dando ênfase para o número e clones de *Streptococcus mutans*. Foram realizadas coletas de biofilme dental e saliva dos membros das famílias (mães e filhos), para contagem de bactérias e análise genética por RP-PCR (“RNA Primed - Polymerase Chain Reaction”) antes e após tratamento odontológico. Foram coletadas também informações sobre hábitos alimentares e a história médica. As crianças com cárie de mamadeira possuíam em média 5.8 log (UFC)/ml, o controle (irmãos) 2.9 log (UFC)/ml, enquanto as mães 4.8 log (UFC)/ml. Todos os indivíduos possuíam dieta rica em carboidratos, embora as contagens de colônias fossem diferentes. Após tratamento odontológico, a concentração de *Streptococcus mutans* na saliva diminuiu e apenas um tipo de clone foi encontrado em cada indivíduo. Os irmãos e as mães albergavam de dois a cinco tipos diferentes de clones. Os autores concluíram que a etiologia da cárie de mamadeira ainda não está bem esclarecida e que deve ser associado a tipagem genética nos novos estudos sobre a doença.

Comparando a seqüência de nucleotídeos do genoma de *Streptococcus mutans*, Igarashi et al.⁴⁴ em 1998, criaram um par de *primers* (MSSD19F e MSSD20R) para identificar espécies de *Streptococcus* orais como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* e *Streptococcus salivarius*. Os autores utilizaram 17 amostras de bactérias, já identificadas em laboratório, e realizaram o PCR e a análise da seqüência de nucleotídeos. Os métodos conseguiram detectar os *primers* utilizados, e também diferenciar as espécies. Os autores concluíram que esta nova técnica é eficaz para a simples e rápida identificação das bactérias estudadas.

Para detectar a presença de *Streptococcus mutans* e relacioná-la com a presença de cárie, cultura de microrganismos e PCR, Allaker et al.⁵ em 1998, realizaram um estudo com 29 dentes recentemente extraídos e 15 dentes in vivo, todos considerados livres de cárie, totalizando 44 sítios. Após a utilização de evidenciador, e remoção de tecido cariado, os autores coletaram amostras de dentina da junção amelo-dentinária. A amostra foi submetida a testes bioquímicos para identificação de *Streptococcus mutans*, e PCR. Os autores removeram tecido desmineralizado de 52% dos dentes e encontraram cultura positiva para *Streptococcus mutans* em 2%, sendo que para os testes de PCR, encontraram este microrganismo em 47%. Concluíram que o método de cultura pode subestimar a presença de bactérias, e a remoção de uma quantidade segura de tecido corado é recomendada para prevenir recidiva de cárie devido a presença ainda de grande número de bactérias residuais.

Considerando a natureza multifatorial da cárie dental, Mattos-Graner et al.⁶² em 1998, sugeriram que os altos níveis salivares de microrganismos causadores da doença, são dependentes do número de dentes irrompidos na cavidade bucal. Estudaram 142 crianças, com 12 a 31 meses de idade, de creches de Piracicaba (SP), coletando amostras de saliva e realizando inspeção visual da cavidade bucal. Os autores encontraram associação positiva estatisticamente significativa entre o número de dentes irrompidos, níveis salivares de *Streptococcus grupo mutans*.

Redmo Emanuelsson e Wang⁷⁷ em 1998, isolaram culturas puras de *Streptococcus mutans* de 11 famílias chinesas (mãe, pai e filho de 3 anos de idade) por meio da coleta de amostras biofilme dental e saliva. As amostras foram cultivadas em meio MSB, e em média 10 colônias foram obtidas de cada indivíduo para identificação por sorotipagem pela técnica de imunofluorescência e genotipagem por DNA *fingerprinting*. Os resultados mostraram que em 4 famílias, as mães compartilhavam o mesmo genótipo com os filhos, em 3 famílias eram os pais que compartilhavam o mesmo genótipo, e em duas famílias todos compartilhavam o mesmo genótipo. Quando comparados os resultados ao exame clínico, quantidade de *Streptococcus mutans* na saliva, prevalência de cárie, saúde geral, dieta e hábitos alimentares, não foi encontrada correlações para as diferentes distribuições de estreptococos intra-familiares.

Procurando investigar a transmissão de *Streptococcus mutans* entre mães e filhos com fissura labial e/ou palatina, de Soet et al.⁸⁸ (1998), realizaram um estudo com 21 pares de mães/filhos, por meio da coleta de saliva e posterior análise por PCR. Os autores observaram que apenas 38% dos pares de amostras de mães/filhos foram idênticos, concluindo que a transmissão dessas bactérias não é freqüente entre mães e filhos com fissura labial e/ou palatina. De acordo com os autores esta pequena porcentagem de transmissão pode ser explicada pelo fato de que outros membros da família também tomavam conta das crianças, e desta forma também poderiam representar fonte de transmissão de cepas diferentes encontradas nas crianças.

Gronroos et al.³⁶ em 1998, analisaram o nível da atividade de bacteriocinas e sua produção por *Streptococcus mutans* isolados na cavidade bucal a partir da sorotipagem, ribotipagem e mutacinotipagem. Os autores analisaram 145 cepas de *Streptococcus* grupo *mutans* de 20 pares mãe-filho, com a idade das crianças variando entre 18 meses a 3 anos, durante um período de 2 anos. Os autores observaram que 88% das cepas encontradas produziram mutacina para mais de 1 das 14 cepas indicadoras (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus pyogenes*). Ribotipos idênticos apresentaram perfil de atividade mutacinogênica similar em um par mãe-filho, tanto inicialmente como após 2 anos. Os autores sugeriram a ocorrência de transmissão em 9 dos 20 pares, com base na presença de cepas idênticas.

A correlação entre a prevalência de cárie e o nível de *Streptococcus* grupo *mutans* é evidente, e a transmissão destes microrganismos vem sendo estudada. Packer et al.⁷² em 1999, analisaram a correlação de níveis desses microrganismos existentes na saliva das crianças e seus respectivos responsáveis. As amostras de saliva foram coletadas de 50 crianças entre 2 a 6 anos de idade da clínica de Odontopediatria da FOUSF, e de seus respectivos responsáveis. Os autores concluíram que devido ao fato das mães ficarem mais em contato com as crianças, existiu similaridade alta (73%) entre os níveis salivares de *Streptococcus* grupo *mutans* de cada par.

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus* são considerados os microrganismos predominantes na cárie dental humana. Baseados nas dificuldades, alto custo e demanda de tempo despendidos para detectar estas bactérias, Ida et al.⁴² em 1999, desenvolveram uma nova sonda baseada no gene *dex* capaz de identificar *Streptococcus sobrinus*. Os autores realizaram testes com *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* e *Streptococcus salivarius*, comprovando a alta sensibilidade da sonda. A sonda desenvolvida pelos autores, denominada SSB-3 é específica para este microrganismo, podendo identificá-lo na presença de pequena quantidade de DNA (5 ng) ou de bactérias (1×10^5 bactérias por amostra).

Analisando 20 pares de pais e 36 crianças japonesas, com idades de 1 a 12 anos, Kozai et al.⁵² em 1999, observaram por meio da técnica análises com endonucleases de restrição (REA), que dos 70 genótipos de *Streptococcus mutans* encontrados nas crianças, 36 (51,4%) também foram encontrados nas mães, e 22 (31,4%) eram semelhantes aos isolados de seus pais. A transmissão mãe-filho foi observada em 18 famílias, e a transmissão pai-filho em 11 delas. Apenas duas das vinte famílias, apresentaram genótipo comum entre os pais. A partir destes resultados os autores sugeriram que as mães, os pais e outras pessoas podem ser vias de transmissão desses microrganismos, e que a colonização inicial ocorre a partir da pessoa mais próxima da criança, a qual geralmente é a mãe.

Slavkin⁸⁵ em 1999, relatou aspectos sobre a ecologia microbiana das lesões de cárie dental, susceptibilidade e prevenção da doença. Entre os fatores determinantes relacionados a susceptibilidade de lesões nas crianças, o autor citou os fatores genéticos inerentes da criança (imunidade), fatores genéticos relacionados aos pais, fatores genéticos das bactérias, transmissão precoce de microrganismos, biofilme dental, ecologia bacteriana, dieta, nutrição, prevenção e detecção precoce da doença. O autor afirmou que o desenvolvimento de uma vacina para a doença está ganhando força nos estudos baseados em biofilme e ecologia bacteriana. No âmbito educacional, o autor ressalta a necessidade de mais intervenções combinadas com programas regulares de prevenção.

Fazendo parte da microbiota indígena da cavidade bucal, os *Streptococcus sanguis* também necessitam de superfícies duras para sua colonização e desta forma competem com os *Streptococcus mutans*. Caufield et al.²¹ em 2000, acompanharam 48 pares mães-filhos, do nascimento aos 3 anos de idade, colhendo amostras bacteriológicas em intervalos de 3 meses para avaliar aquisição inicial de *Streptococcus mutans*. A identificação foi realizada inicialmente por testes bioquímicos, e posteriormente pela análise genética (PCR) de 20 isolados. Os autores concluíram que a colonização por *Streptococcus sanguis* ocorreu em uma discreta “janela de infecção” em média aos 9 meses de idade, a qual dependeu da erupção dentária. Observou também que a colonização por *Streptococcus sanguis* foi inversamente proporcional a colonização por *Streptococcus mutans*, sugerindo portanto, uma competição entre esses microrganismos

Com o objetivo de conhecer a diversidade de clones e o modelo de colonização por *Streptococcus* grupo *mutans* em humanos, Gronroos e Alaluusua³⁵ em 2000, estudaram sete crianças cárie ativas entre 3 e 7 anos de idade, por meio de amostras de saliva, de esmalte sadio, de dentina cariada superficial e de dentina cariada profunda. De 55 amostras, um total de 598 isolados de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram submetidos à técnica de AP-PCR. Os autores observaram que cada criança albergava de um a quatro clones diferentes de *Streptococcus mutans*, sendo que em três crianças, esta diferença foi dependente do sítio analisado. Os autores concluíram que os clones

desses microrganismos colonizaram seletivamente sítios específicos, e que amostras de saliva não revelaram realmente todos os tipos existentes na cavidade bucal. Desta forma os autores citaram que para uma análise qualitativa, é necessário coleta de amostras de vários locais da cavidade bucal.

Algumas variações na técnica de PCR para simplificar e agilizar a detecção de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* estão sendo estudadas. A utilização de amostras de saliva pode levar à resultados contraditórios, uma vez que os componentes salivares podem inibir a amplificação por PCR, sendo mais indicada a utilização de biofilme dental. Baseados neste fato, Oho et al.⁷⁰ em 2000, desenvolveram uma variação da técnica, utilizando dois genes: *gtfB* para *Streptococcus mutans* e *gtfI* para *Streptococcus sobrinus*. Foi realizado um primeiro PCR, com esses genes, o qual amplificou os fragmentos de DNA. O segundo PCR foi realizado utilizando o produto do primeiro PCR, sendo este segundo capaz de detectar quantidades mínimas de microrganismos ($>10^4$ UFC/ml). Esta técnica utilizou pequena quantidade de saliva, e os componentes salivares não interferiram na detecção dos microrganismos, evitando falso-positivos. Com este método os autores acreditaram obter informações sobre quantidade e qualidade dessas bactérias através de amostras da saliva, de forma mais rápida e simples.

Lucas et al.⁵⁹ em 2000, identificaram a prevalência de *Streptococcus* grupo *mutans* na cavidade bucal de 33 crianças, com idade de 5 a 16 anos, após duas

coletas de saliva com intervalo de quatro meses. Foi fornecida a mesma dieta balanceada durante três dias para cada participante da pesquisa, antes das coletas de saliva. Foram identificadas de três a dez tipos de colônias diferentes de *Streptococcus mutans* em cada criança, não havendo diferença estatisticamente significativa na composição bacteriana entre as duas coletas. Os autores observaram maior frequência de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus parasanguis*. Comparando as proporções de 9 espécies de estreptococos orais, os autores relataram que esta microbiota em termos de espécie permaneceu estável.

Por meio de revisão de literatura, Rosa e Sanches⁷⁹ em 2000, reuniram conhecimentos sobre *Streptococcus mutans*, transmissibilidade, risco de cárie e prevenção. Os autores observaram que o agente etiológico principal da cárie dental é o *Streptococcus mutans*, e que a infecção precoce por este microrganismo aumenta o risco de desenvolvimento de lesão de cárie nas crianças. Concordaram que as mães representam a principal fonte de infecção, e devem portanto ser alvo de medidas que evitem a transmissão dessas bactérias. Os autores relataram porém, que ainda são necessários estudos que estabeleçam o papel da frequência de contatos maternos para transmissão, a extensão da transmissão extrafamiliar e o papel dos anticorpos em relação ao risco de cárie nas crianças.

Baseado no 9th Symposium of the National Institute of Infectious Diseases, Tóquio, em 1999, Hanada³⁸ em 2000, reuniu aspectos como a

cariogenicidade do *Streptococcus mutans*, sua rota de infecção, relacionou o consumo de açúcar à cárie dental, e o desenvolvimento de vacina contra esta doença. Como conclusão, relatou que de acordo com as pesquisas clínicas, as mães representam a principal fonte de transmissão desses microrganismos, sendo que medidas simples como a utilização de clorexidina, pode reduzir a quantidade dessas bactérias na saliva em até 99%. O autor ressaltou também que a doença cárie deve ser controlada, eliminando-se a cadeia de infecção entre mãe e filho.

Com o objetivo de determinar o potencial cariogênico de diferentes espécies *Streptococcus* grupo *mutans*, isolados ou associados, Pereira et al.⁷³ em 2000, analisaram a formação in vitro de biofilme bacteriano, produção de polissacarídeos extracelulares e capacidade de produção de ácidos de 150 cepas de *Streptococcus mutans*, 27 de *Streptococcus sobrinus*, 15 de *Streptococcus rattus*, 9 de *Streptococcus mutans* V, apenas uma de *Streptococcus cricetus* e uma de *Streptococcus ferus* e uma de *Streptococcus downei*. Os resultados demonstraram que o *Streptococcus rattus* e a associação de *Streptococcus mutans* com *Streptococcus sobrinus* produziram maiores quantidades de biofilme bacteriano. Os autores observaram também que as espécies de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* apresentaram a maior produção de carboidratos ácidos solúveis, levando a conclusão que indivíduos multicolonizados apresentam maior tendência de desenvolver lesões de cárie dental.

Couto et al.²² em 2000 observaram a relação entre hábitos alimentares e de higiene bucal, assim como a relação entre índices de cárie dentária e higiene bucal, os quais pudessem favorecer a transmissibilidade da doença cárie entre mães e filhos. Após a realização de exames clínicos e análise microbiológica, os autores concluíram que o baixo consumo de sacarose de mãe e filho, assim como o hábito escovação após as refeições, indicou redução no risco de transmissão da doença.

Baseados no fato de que a realização inadequada da escovação pode se tornar fonte de transmissão de inúmeras doenças, Brandão et al.¹⁷ em 2001, avaliaram as formas de acondicionamento das escovas dentárias em creches municipais do Rio de Janeiro. Observaram que 56% das creches apresentaram escovas acondicionadas com resíduos, predominantemente creme dental, 46% da forma de acondicionamento das escovas permitiam contato direto entre as mesmas e 73% das escovas permaneciam descobertas. Os autores sugeriram a normalização das ações de higienização bucal e implantação de programa de motivação e capacitação educativo e preventivo a todas as creches.

Os níveis de infecção por *Streptococcus mutans* de 101 crianças, de 12 a 30 meses de idade, foram investigados por Mattos-Graner et al.⁶⁴ em 2001, por meio de uma coleta salivar inicial e outra após o período de 1 ano. As amostras foram cultivadas em meio MSB, e posteriormente foi realizada a contagem de colônias (UFC). Os autores não encontraram associações entre os níveis salivares

de *Streptococcus mutans* com hábitos alimentares, presença de biofilme, ou presença de novos dentes na cavidade bucal. Observaram que ocorreu um aumento do microrganismo nos níveis salivares após um ano nas crianças entre 12 a 24 meses, e diminuição dos mesmos nas crianças entre 25 a 30 meses de idade. Os autores concluíram que os níveis salivares do microrganismo estão relacionados com a atividade de cárie, e que estes tendem a se estabilizar após os dois anos de idade.

Igarashi et al.⁴³ em 2001 desenvolveram um método para detecção e identificação genética simultâneas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, e *Streptococcus salivarius*. Sabendo que os *Streptococcus* grupo *mutans* possuem genes que codificam antígenos específicos de proteínas de superfície e dextranase (*dex*), e que a amplificação por PCR dos fragmentos de *dex* pode facilmente identificar diferentes espécies de *Streptococcus* grupo *mutans*, os autores, utilizaram 25 amostras de cinco espécies de bactérias de *Streptococcus* grupo *mutans* para amplificação do *dex* gene. O DNA das amostras foi extraído e realizou-se eletroforese por gel de agarose, juntamente com as proteínas (*dex*) homólogas conhecidas comercialmente para cada microrganismo. Os autores sugeriram que a amplificação por PCR do *dex* gene é útil para uma rápida identificação das quatro espécies de *Streptococcus mutans* estudadas.

Para verificar a experiência de cárie e sua distribuição em 989 crianças de 2 a 5 anos de idade, Lira et al.⁵⁸ (2001), realizaram um estudo em creches das cidades de Aracaju (SE), Bayeux (PB), João Pessoa (PB) e Recife (PE). Por meio de inspeção visual, registraram o índice ceo-d, e observaram aumento significativo da experiência de cárie nas crianças mais velhas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre sexos. Os autores concordaram com a necessidade de elaboração de programas que possibilitem a diminuição da prevalência de cárie dentária, ainda na dentição decídua em desenvolvimento.

A partir da aplicação de um questionário dirigido sobre os hábitos alimentares de pares mãe/filho, realização de coleta de saliva e biofilme dental, Wan et al.¹⁰³ em 2001, avaliaram 172 crianças de aproximadamente 6 meses de idade e suas respectivas mães. Os autores detectaram a presença de *Streptococcus mutans* em 60% crianças edêntulas, aos 6 meses de idade. Puderam confirmar seus resultados após 6 meses, em uma segunda avaliação microbiológica. Crianças que receberam alimentos mais sólidos, dormiam junto com a mãe, se alimentam de livre demanda, consumiam grande quantidade de açúcar, sugavam os dedos dos adultos, possuíam mães com problemas periodontais e alta atividade de cárie, apresentaram maior porcentagem dessas bactérias.

Visando fornecer dados quanto ao período de erupção dos primeiros molares permanentes, bem como cuidados a serem tomados para prevenção de lesão de cárie, Fonseca et al.³⁰ em 2001, realizaram estudo em creches de Ribeirão

Preto (SP), com 600 crianças menores de 6 anos de idade. Observaram por meio de exames clínicos que 7% das crianças de 3 anos de idade, já apresentavam os primeiros molares permanentes irrompidos. Das crianças com 4 e 5 anos de idade, 17,2% e 29,2% respectivamente, já apresentavam o primeiro molar permanente. Os autores concluíram que foi bastante significativo o número de crianças abaixo de seis anos de idade (20,5%) que apresentaram erupção dos primeiros molares permanentes, e que já apresentavam lesões de cárie (18,1%). Sendo assim os autores relataram a necessidade de atenção às crianças menores de seis anos no sentido de monitorar a saúde bucal das mesmas.

Com o propósito de determinar a prevalência de cárie e a sua associação com condições de higiene bucal, alimentação e uso de fluoretos em crianças de 0-30 meses de idade de creches públicas do Governo do estado da Bahia, Barros et al.¹¹ (2001), realizaram exames clínicos em 340 crianças, determinando o índice ceo-d e as condições de higiene bucal. Foi entregue também um questionário aos responsáveis pelas crianças, com questões relacionadas à orientação quanto a saúde bucal, aleitamento noturno, exposição a fluoretos e saúde geral. Os autores encontraram alta prevalência de cárie nas populações estudadas, com aumento de sua prevalência de forma significativa em função da idade, e do número de dentes irrompidos. A higiene bucal deficiente indicou associação positiva com a presença de lesão de cárie, sugerindo atenção a saúde bucal em idades menores por meio da utilização de métodos educativos e preventivos.

Procurando desenvolver uma nova técnica para identificação de diferentes espécies de estreptococos, Thurnheer et al.⁹⁶ em 2001, criaram uma rápida hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), utilizando oligonucléicos específicos de rRNA para sequenciamento de *Streptococcus anginosus*, *mitis*, *mutans* e *salivarius*. Os autores utilizaram amostras de trinta diferentes espécies de bactérias para testar a especificidade do teste. A técnica mostrou-se efetiva e rápida na identificação e quantificação de microrganismos do biofilme dental. Os autores concluíram que a utilização desta técnica fornece ganho de tempo em relação às técnicas de cultura e PCR.

Estreptococos orais eram inicialmente identificados pela morfologia colonial, e posteriormente por reações bioquímicas imunológicas e testes genéticos. Estes procedimentos, porém demandam período longo de tempo e os resultados não são sempre satisfatórios. Para resolver estes problemas, testes moleculares utilizando PCR foram desenvolvidos. Para provar a eficácia deste método e estabelecer espécies específicas para *Streptococcus salivarius*, Igarashi et al.⁴⁵ em 2001, realizaram testes de PCR e por meio de sonda de DNA com diversas espécies de estreptococos. Os autores observaram que estes testes são altamente específicos para *Streptococcus salivarius*, e bastante úteis para detecção e identificação desta bactéria.

Em estudo longitudinal, Redmo Emanuelsson e Thornqvist⁷⁶ em 2001, avaliaram 13 crianças de três anos de idade inicialmente livres de *Streptococcus*

mutans, assim como seus respectivos pais. Essas crianças foram observadas após alguns anos (2 a 5 anos) quando foram encontrados *Streptococcus mutans* em apenas três delas. Por meio de análise genotípica de DNA *fingerprinting*, das três crianças que apresentavam colônias, uma estava contaminada com um genótipo idêntico ao da mãe, outra com um idêntico ao do pai, e a terceira, com um genótipo “próprio”, não encontrado nos pais. Após observar que nenhum dos pais apresentavam genótipos iguais, os autores concluíram que é difícil acontecer a colonização entre adultos e sugeriram possível contaminação horizontal.

Visando avaliar o perfil de colonização dos *Streptococcus* grupo *mutans* em indivíduos que apresentavam lesões de cárie coronária e radicular, Nascimento et al.⁶⁷, em 2001, utilizaram a técnica de AP-PCR para confirmação da identidade molecular das amostras de saliva, biofilme dental e tecido das lesões de cárie coletados. Os autores observaram que os indivíduos estavam colonizados por *Streptococcus mutans* (56%) e *Streptococcus sobrinus* (30%), com diferença na frequência de distribuição dos genótipos de *Streptococcus mutans* de acordo com os diferentes sítios pesquisados. Os autores concluíram que diferentes tipos clonais de *Streptococcus* grupo *mutans* podem colonizar seletivamente sítios específicos da cavidade bucal de indivíduos, podendo apresentar propriedades fenotípicas diferentes.

Os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, rotineiramente identificados pelo crescimento em meios seletivos, morfologia colonial e

características bioquímicas, estão atualmente, sendo diferenciados por meio de testes genéticos. Li et al.⁵⁶ em 2001, avaliaram o poder discriminatório da técnica de AP-PCR em diferenciar essas duas espécies. Utilizaram dez amostras de bactérias de seus bancos de estudos, e coletaram mais vinte amostras de três países (Estados Unidos, China e Suécia). As amostras foram examinadas simultaneamente por meio de testes bioquímicos (fermentação de carboidratos), AP-PCR e DNA *fingerprinting* (testes genético) para diferenciação das espécies. Os resultados mostraram pobre especificidade (38.5%), e baixa concordância (66.7%) para o teste bioquímico. A sorotipagem exibiu 100% de sensibilidade, 90% de especificidade e 86,7% de concordância com o DNA *fingerprinting*. Os dois testes genéticos demonstraram 100% de concordância para a diferenciação das duas espécies bacterianas. Os autores concluíram que os dois testes são alternativas viáveis para sorotipagem e biotipagem de *Streptococcus grupo mutans*.

Pimenta et al.⁷⁴ em 2001, avaliaram a presença de *Streptococcus grupo mutans* na saliva de 93 indivíduos de seis famílias brasileiras, membros de no mínimo, três gerações (73 adultos e 20 crianças). As amostras foram cultivadas em SB20 e as colônias características foram submetidas a biotipagem. Todos os adultos estavam colonizados por *Streptococcus grupo mutans* enquanto apenas sete crianças albergavam estes microrganismos. *Streptococcus mutans* foram encontrados em 78 (97,5%) indivíduos, sendo que 51 (63,7%) eram monocolonizados. *Streptococcus sobrinus* foram isolados de 29 (36,3%)

membros, sendo que 2 (2,5%) estavam monocolonizados. Vinte e sete indivíduos (33,8%) albergavam os dois microrganismos. Os autores concluíram que a alta prevalência de *Streptococcus* grupo *mutans* encontrada na saliva das famílias estudadas sugere o risco de transmissão intrafamiliar.

A microbiota predominante da dentina infectada de 52 dentes cariados de crianças de 3 a 5 anos de idade, acometidas por cárie rampante, foi comparada com a microbiota predominante de superfícies sadias de esmalte de crianças livres de cárie, por Marchant et al.⁶¹ em 2001. As amostras foram cultivadas em meio seletivo para *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces* e *Candida albicans*, e depois, analisadas geneticamente por PCR. Os autores encontraram predominantemente *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Lactobacillus spp.* em lesões de cárie, e *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces* em esmalte sadio. Variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie foi encontrada em diferentes dentes cariados da mesma criança, sugerindo a existência de uma microbiota inespecífica nas lesões de cárie rampante.

A partir da observação do número de dentes erupcionados, número de lesões de cárie e amostra de saliva, Mattos-Graner⁶³ em 2001, avaliou por meio da técnica de AP-PCR a diversidade de *Streptococcus* grupo *mutans* em 35 crianças de creches, com idade entre 12 e 30 meses. As crianças frequentavam nove creches da cidade de Piracicaba (SP) durante cinco dias por semana, dez horas por

dia e recebiam quatro refeições diárias ricas em sacarose. Das amostras coletadas, foram obtidos 74 isolados de *Streptococcus mutans*, 2 de *Streptococcus sobrinus* e detectados dois ou mais genótipos por criança. Os autores encontraram genótipos iguais de *Streptococcus mutans* entre 2 crianças que compartilhavam o mesmo ambiente, sugerindo transmissão horizontal deste microrganismo. Observaram também a não associação entre diversidade genotípica de *Streptococcus* grupo *mutans* e idade, número de dentes erupcionados, nível dessas bactérias e prevalência de cárie.

A distribuição das espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* presentes na cavidade bucal de dez voluntários livres de cárie e dez voluntários cárie-ativos, assim como o potencial cariogênico in vitro dos isolados de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, foram comparados por Napimoga et al.⁶⁵ em 2001. As amostras foram coletadas da saliva, biofilme dental e dorso da língua. Os isolados foram identificados bioquimicamente e o potencial cariogênico analisado por meio da medição da capacidade de produção de ácido. Os autores encontraram maior quantidade de *Streptococcus mutans* nos dois grupos estudados, e maior produção de ácido por este mesmo microrganismo, independente do sítio analisado.

Preocupados com a contaminação de escovas dentais por bactérias cariogênicas, Macari et al.⁶⁰ em 2001, estudaram o desenvolvimento de *Streptococcus* grupo *mutans* nas cerdas de escovas e métodos para desinfetá-las.

Dezenove crianças receberam instruções para escovar os dentes uma vez ao dia durante cinco dias. As escovas foram recolhidas e divididas em três grupos de acordo com o método de desinfecção: imersas em água de torneira esterilizada, solução de gluconato de clorexidina 0,12%, e solução de hipoclorito de sódio a 1%. Os resultados mostraram desenvolvimento de *Streptococcus grupo mutans* nas cerdas das escovas do grupo que foram imersas em água de torneira, comprovando a contaminação, e sugerindo uma possível contaminação cruzada dependendo da forma de armazenamento.

Por meio de revisão sistemática da literatura, Tanzer et al.⁹⁴ em 2001, ressaltaram que o grupo dos *Streptococcus mutans* é o principal iniciador de lesões de cárie na superfícies lisas e em fissuras. Citaram também que os *Lactobacillus spp* também estão envolvidos na progressão da lesão e cárie, mas seu papel ainda não está bem definido. De acordo com os autores, o estudo molecular e genético dessas bactérias, demonstraram que elas podem ser transmitidas verticalmente na população, mas não exclusivamente de mãe para filho. Concluíram que as pesquisas devem ser direcionadas para estudos clínicos microbiológicos, e que a cárie deve ser considerada uma doença, e não mais uma lesão.

Visando criar um método para detectar amostras de *Streptococcus mutans* potencialmente cariogênicas e avaliar o risco de aquisição de cárie dental, Galaviz et al.³³ em 2002, coletou biofilme dental de 38 crianças com média de 5 anos de

idade. As amostras foram cultivadas em BHI e o DNA foi extraído para utilização na técnica de PCR pela marcação do gene *spaP*. Este gene se une com o *dexA* e *AgI/II*, que estão relacionados à aderência do *Streptococcus mutans* com a superfície dental. Da amostra estudada, 79% das crianças eram cárie ativas enquanto 21% estavam livres de cárie. Todos os pacientes com cárie, mostraram-se positivos para o *spaP*. Os autores concluíram que pela tecnologia de PCR é possível identificar o risco individual de cárie, podendo ser incluído em programas para controle da doença.

Procurando investigar a transmissão de *Streptococcus mutans* entre adultos de famílias chinesas, Nie et al.⁶⁹ em 2002, coletou amostras de biofilme dental e saliva de 11 casais que estavam vivendo juntos há pelo menos há dois anos. Através de testes bioquímicos (manitol, sorbitol, rafinose, melibiose, arginina e bactracina) e genéticos (DNA *fingerprinting*), identificaram as colônias coletadas. Foi realizada uma coleta inicial e outra ao final de 3 meses, sendo que nenhuma mudança nos genótipos foi encontrada em oito casais. Em um casal os mesmos genótipos foram encontrados na primeira coleta, porém na segunda os indivíduos albergavam genótipos diferentes. Os autores sugeriram a transmissão de *Streptococcus mutans* entre adultos, porém transitória, pois o novo microrganismo dificilmente consegue colonizar o novo ambiente.

Com o objetivo de avaliar a prevalência de cárie e de fatores de risco em crianças com idade de até 36 meses, cadastradas no ambulatório de Pediatria do

Hospital Universitário Pedro Ernesto do Rio de Janeiro, Santos e Soviero⁸⁰ em 2002, coletaram dados relativos às condições sócio-econômicas-culturais, hábitos de higiene bucal, dieta, presença de cárie, de biofilme dental e sangramento gengival. Os autores encontraram associação estatisticamente significativa entre lesão de cárie e presença de biofilme dental, sugerindo que este foi o fator preponderante para ocorrência desta doença na amostra estudada.

Becker et al.¹³ em 2002, compararam as bactérias encontradas em amostras de biofilme dental de quatro sítios da cavidade bucal de crianças livres de cárie, assim como de esmalte intacto, lesão de mancha branca, superfície de lesão cavitada e dentina escavada de lesão cariada de crianças cárie ativas. Após análise por PCR e *chechenboard* os autores observaram diferenças entre algumas espécies encontradas. *Actinomyces gerencseriae* e demais *Actinomyces* estavam relacionadas com lesões iniciais, e as espécies *Bifidobacterium* estavam relacionadas com cáries profundas. Os autores concluíram que o *Streptococcus sanguis* estava relacionado com as crianças livres de cárie e o *Streptococcus mutans* com as crianças acometidas pela doença.

Com o objetivo de detectar e monitorar longitudinalmente a aquisição de *Streptococcus* grupo *mutans* por crianças livres de cárie, Flório et al.²⁸, em 2002, coletou bimestralmente por um período de 10 meses, amostras de saliva e biofilme de crianças inicialmente edêndulas, matriculadas em creches municipais de Piracicaba (SP). Por meio da técnica do PCR para confirmação molecular da

identidade de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, observaram que em 46% das crianças, a colonização persistente ocorreu entre o 12º e o 20º mês de vida. Os autores sugeriram reconsideração nas diretrizes de alguns programas de odontologia precoce, já que os resultados demonstraram variação no período estabelecido na literatura como janela de infectividade²⁰.

Com o objetivo de estudar a distribuição das espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* em diferentes nichos da cavidade bucal e analisar seu potencial cariogênico in vitro, Stipp et al.⁹³, em 2002, selecionaram dezesseis voluntários que apresentavam lesões de cáries oclusais incipientes, ativas e paralisadas sob controle odontológico por três anos em primeiros molares permanentes. As amostras foram coletadas da saliva, superfície oclusal cariada e superfície hígida, sendo o potencial cariogênico dos isolados analisados por meio da produção de ácido. Nos dois tipos de lesões foram encontradas maiores quantidades de *Streptococcus mutans* do que *Streptococcus sobrinus*. Em lesões de cárie ativa os isolados mostraram maior capacidade de redução do pH do meio, sugerindo a existência de diferenças nos fatores de virulência apresentados por microrganismos de lesões ativas ou inativas.

Yano et al.¹⁰⁵, em 2002, estudaram uma técnica de quantificação de *Streptococcus mutans* através da análise genética, denominada de *real-time PCR*. De acordo com os autores, esta técnica possui vantagens em relação as culturas de bactérias convencionais, uma vez que a última necessita de maiores passos

laboratoriais para isolar, quantificar e identificar as diversas variedades de *Streptococcus* grupo *mutans*. O real-time PCR quantifica rapidamente e facilmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* independentemente. Utiliza glicosiltransferases, enzimas que os *Streptococcus mutans* possuem e estão relacionadas com sua capacidade cariogênica. Os autores relataram que o real-time PCR é vantajoso, pois detecta o DNA dos microrganismos mesmos se estiverem mortos, não necessitando assim de culturas. Também é muito utilizado em diagnóstico de bactérias anaeróbias e vírus. Os autores ressaltaram que a nova técnica será útil para identificar facilmente o risco de cárie e também quantificar outras bactérias orais.

Baseados no fato de que os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* estão associados com o desenvolvimento da cárie dentária, Okada et al.⁷¹ em 2002, detectaram a presença destas bactérias por meio da técnica de PCR e compararam-na com a incidência de cáries em 77 estudantes pré-escolares de 3 a 5 anos de idade. As amostras de biofilme foram coletadas de escovas dentais. A prevalência de isolamento foi de 72,8% para *Streptococcus mutans* e 61,1% para *Streptococcus sobrinus*. Os resultados do PCR mostraram que as crianças com a presença das duas bactérias apresentaram alta prevalência de cárie, em relação àquelas que apresentaram apenas *Streptococcus mutans*.

Ramos-Gomez et al.⁷⁵ em 2002, estudaram 146 crianças com idade de 3 a 55 meses, cadastradas no Hospital geral de São Francisco, Califórnia, procurando

relacionar aspectos demográficos e comportamentais com níveis específicos de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, níveis de cálcio, fosfato e flúor, e lesões de cárie na infância. Foi realizada anamnese, exame clínico bucal, e coleta salivar para qualificar e quantificar *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp*. Os resultados mostraram associação significativa entre cárie dental e níveis bacterianos, e que crianças de 7 a 9 meses já estavam contaminadas com *Streptococcus mutans*. A maioria das crianças que apresentavam lesões de cárie era de baixa renda, filhas de mães solteiras e baixo nível educacional. Os autores não encontraram relação entre as taxas de flúor, fosfato e cálcio, e a ocorrência da doença. Concluíram que a lesão de cárie está relacionada diretamente com o nível de bactérias presentes, com aspectos demográficos e comportamentais.

Por meio de estudo de 200 pares de mãe-filho, Thorild et al.⁹⁵ em 2002, procuraram estabelecer a prevalência e a possível colonização de *Streptococcus mutans* em crianças contaminadas por suas mães. Os autores coletaram saliva ou biofilme dental de crianças menores de 3 anos e realizaram o cultivo do material para contagem de colônias (UFC) em lupa estereoscópica. Os resultados mostraram que 50% das mães, 30% das crianças com 18 meses e 42% das crianças com 3 anos de idade, exibiram altos níveis salivares de *Streptococcus mutans*. Relação estatisticamente significativa foi encontrada entre alto nível bacteriano das mães e das crianças. Fatores como ingestão diária de alimentos açucarados, mamadeiras adoçadas, falta de higiene bucal diária e mamadeira noturna, mostraram-se significantes para colonização de *Streptococcus mutans* nas

crianças. Os autores afirmaram a existência da transmissão vertical, enfatizando a importância da dieta e prevenção primária para mães com altos níveis de colonização por este microrganismo.

A técnica de PCR está sendo empregada para rápida identificação de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, mostrando-se ineficiente para a identificação de outras espécies, pois necessita de desenvolvimento e preparação de *primers* específicos. Desta forma, Sato et al.⁸¹ em 2003 desenvolveram um método simples utilizando fragmentos restritos de ribossomo RNA 16S, para a identificação de sete diferentes espécies do grupo *Streptococcus mutans*, por meio da amplificação desse gene e digestão dos produtos pelo *HpaII* e *HaeIII* (PCR-RFLP). O *HpaII* produz seis padrões moleculares para amostras conhecidas de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downi* e *Streptococcus ferus*. Já os produtos obtidos pelo *HaeIII*, conseguem separar essas três diferentes espécies. Utilizando amostras de bactérias clinicamente preparadas, isoladas e identificadas em laboratório, os autores conseguiram, através de *primers* universais e com auxílio deste protocolo, identificar as espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* e *Streptococcus rattii*. De acordo com os autores, a técnica de PCR-RFLP pode ser uma alternativa para identificação de *Streptococcus mutans* e pode ser aplicada em estudos sobre a cariogenicidade desses microrganismos.

Leal et al.⁵⁴ em 2003, avaliaram a contaminação bacteriana de escovas dentais e sua relação com as condições de saúde bucal de crianças carie ativas e livres de cárie. As escovas foram coletadas após de uma única escovação supervisionada com creme dental sem antimicrobiano, e analisadas pela técnica de contagem de *Streptococcus mutans* e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os autores observaram que as culturas foram positivas para 86,6% das escovas de ambos os grupos, porém sem associação com a presença de lesão de cárie ou condições de saúde bucal.

Considerando a utilização de brinquedos em salas de espera de consultórios Odontopediátricos, Carvalho et al.¹⁹ em 2003, avaliaram a possibilidade de desinfecção dos mesmos, utilizando brinquedos novos inoculados com *Streptococcus salivarius*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e brinquedos usados, coletados em consultórios odontológicos. A desinfecção foi realizada com glutaraldeído de sódio a 2% (GI), fricção com álcool a 70% (GII) e lavagem com sabão de coco e escova. Os autores observaram por meio do cultivo e contagem de microrganismos, que todos os brinquedos apresentavam-se contaminados antes da desinfecção, e após esta, 100% dos objetos estavam livres destas bactérias, independente do método utilizado.

Examinando amostras de biofilme dental de treze voluntários com idade variando entre 20 a 40 anos, Redmo Emanuelsson et al.⁷⁸ em 2003, procuraram esclarecer a distribuição de *Streptococcus mutans* em diferentes sítios da cavidade

bucal. O biofilme foi coletado em intervalos de 4 a 7 meses das superfícies mesial e lingual do primeiro molar permanente inferior direito, superfície distal do primeiro pré-molar permanente superior esquerdo, e superfície mesial do segundo pré-molar superior esquerdo. Após a identificação das cepas pela técnica de PCR, foi realizada a genotipagem por RAPD (AP-PCR) utilizando-se *primers* arbitrários. Os resultados mostraram que em um mesmo indivíduo os genótipos foram encontrados em sítios diferentes. Os autores concluíram que um mesmo sítio pode albergar genótipos diferentes, e também que um mesmo genótipo pode colonizar vários sítios na cavidade bucal.

Para determinar se a técnica de reação em cadeia da polimerase de primers arbitrários (AP-PCR) é eficaz para diferenciar geneticamente diferentes clones de *Streptococcus mutans*, Spolidorio et al.⁹⁰ em 2003, estudaram 22 famílias brasileiras, por meio da coleta de saliva estimulada do pai, da mãe e filhos. A amostra constituiu-se de 374 isolados identificados como *Streptococcus mutans*, os quais foram analisados por meio da técnica de AP-PCR, utilizando o *primer* OPA-13. Das vinte e duas famílias analisadas, três pais possuíam amostras similares de suas crianças (13,7%). Vinte bebês albergavam amostras similares à das suas mães (54,5%), e sete apresentavam amostras semelhantes as dos seus irmãos (31,8%). Os autores concluíram que esta técnica foi eficaz em demonstrar a heterogeneidade genética de *Streptococcus mutans* entre os membros das famílias analisadas.

Com o objetivo de comparar a diversidade fenotípica/genotípica de *Streptococcus mutans*, Kamiya⁴⁶, em 2003, isolou 319 cepas de *Streptococcus mutans* de 8 voluntários cáries ativos e 8 voluntários livres de cárie. O polimorfismo genético foi detectado por meio da técnica de AP-PCR com os primers *OPA-02* e *OPA-13*. Utilizando a Mutacinotipagem, pôde-se detectar 55 perfis fenotípicos, enquanto 101 perfis genéticos polimórficos foram detectados pelo AP-PCR. O grau de associação entre as duas técnicas de foi em média de 77,38%, sendo o poder discriminatório da AP-PCR superior ao da Mutacinotipagem. Desta forma a autora concluiu que a Mutacinotipagem é melhor para detectar a diversidade fenotípica e o AP-PCR a diversidade genotípica de *Streptococcus mutans*.

Para avaliar a transmissão vertical de mãe para filho e/ou horizontal entre crianças que compartilham o mesmo ambiente, Klein⁴⁷, em 2003, observou 16 pares mãe-filho, com as crianças na faixa etária entre 4 e 6 meses de idade, matriculadas em creches municipais de Piracicaba (SP). As amostras de saliva foram coletadas bimestralmente num período médio de 19,2 meses. Após análise genética por AP-PCR, a autora encontrou transmissão vertical de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* em 13 e 5 pares, respectivamente, porem não encontrou transmissão horizontal entre as crianças.

Para avaliar a contaminação microbiana de escovas dentais de 39 indivíduos e a eficácia da desinfecção dessas escovas por dois agentes

microbianos, Barbosa et al.¹⁰, em 2003, realizaram um estudo borrifando spray de água de torneira esterilizada, gluconato de clorexidina a 0,12% e cloreto de cetilpiridínio a 0,05%, após a escovação durante 1 minuto com dentifrício e enxágüe das escovas com água. Os procedimentos de escovação foram divididos em três etapas de acordo com cada solução, com intervalos de 96 horas. Os autores encontraram após a cultura microbiana das escovas, a presença de *Streptococcus* grupo *mutans* em 76,9% das escovas borrifadas com água, em 10,2% das escovas borrifadas com cloreto de cetilpiridínio a 0,05%, e não observaram colonização nas escovas borrifadas com gluconato de clorexidina a 0,12%.

Após o preparo manual de cavidades preconizadas pela técnica do Tratamento Restaurador Atraumático (TRA), Toi et al.⁹⁷ em 2003, realizaram duas coletas de dentina infectada, sendo a primeira no centro da junção amelo-dentinária antes da remoção manual da cárie, e a segunda, próxima a polpa após a remoção do tecido cariado. Por meio da utilização do PCR os autores observaram significativa diminuição do número de *Streptococcus mutans* após a remoção manual do tecido cariado, demonstrando a eficácia da técnica.

Para avaliar a colonização da cavidade bucal de crianças por *Streptococcus mutans* e por *Streptococcus sobrinus*, Klein et al.⁴⁸ em 2003, acompanharam 16 pares de mãe-filho por 20 meses, coletando bimestralmente amostras de saliva no dorso da língua, rodete gengival e biofilme dental. As amostras de saliva das mães

foram coletadas em uma única sessão, e das crianças a partir do sexto mês de vida. Os isolados foram identificados por PCR como *Streptococcus mutans* (n = 968) e *Streptococcus sobrinus* (n = 111) e analisados pela técnica de AP-PCR. No momento da aquisição, as crianças albergavam de 1 a 4 genótipos distintos de *Streptococcus mutans* e apenas 1 genótipo de *Streptococcus sobrinus*. Durante a avaliação longitudinal, observou-se aumento do número de genótipos de ambas as espécies, sendo que alguns permaneceram estáveis e outros foram adquiridos e/ou perdidos. Os autores sugeriram que os genótipos adquiridos, podem ter tanto estabilidade efetiva como transitória, refletindo o processo de desenvolvimento da microbiota bucal nas crianças.

O método de PCR direto foi criado para detectar *Streptococcus mutans* direto de amostras de biofilme dental, utilizando *primers* específicos, sem a necessidade de cultura e isolamento bacteriano. A amplificação do DNA bacteriano específico pode ser influenciada pela presença de outros DNA bacterianos extraídos de amostras de biofilme dental, resultando na redução da sensibilidade do teste. Desta forma, Sato et al.⁸² em 2003, desenvolveram um método para rápida e sensível detecção de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* denominado “*nested* PCR”. Este teste consiste em amplificar o DNA com *primers* universais e realizar o PCR com *primers* específicos, o que permite amplificar o DNA específico da bactéria com alta sensibilidade. Os autores compararam os dois métodos e observaram que o “*nested* PCR” utilizando o gene *16S* rRNA, foi realmente mais rápido e sensível.

Com o objetivo de investigar a diversidade genotípica e a possível transmissão horizontal de *Streptococcus mutans* entre crianças que compartilham o mesmo ambiente, Emídio²⁶ em 2003, estudou 20 crianças com idade média de 23 a 26 meses, matriculadas em creches municipais de Piracicaba (SP). Com amostras de saliva, do dorso de língua e biofilme dental, ele submeteu colônias isoladas à técnica de PCR, para confirmação molecular. Os identificados como *Streptococcus mutans* (n = 114) foram analisados pela técnica do AP-PCR, utilizando o *primer* OPA-02. Os resultados não indicaram ocorrência de transmissão horizontal dessas bactérias entre as crianças que compartilhavam a mesma classe da creche.

O monitoramento de colonização por *Streptococcus mutans* e sua relação com o desenvolvimento de lesões de cárie foram realizados por Flório et al.²⁹ em 2003, durante 24 meses em 29 crianças. Para confirmação molecular da identidade de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, amostras da saliva e biofilme foram cultivadas e seus produtos isolados para realização da técnica de PCR. As coletas iniciaram quando as crianças possuíam 6 meses e a primeira cultura positiva ocorreu aos 15,4 meses de vida. A colonização persistente dos dois microrganismos foi verificada em 72,4 % da amostra, aos 17,7 meses, período anterior ao momento crítico estabelecido na literatura para implantação de *Streptococcus grupo mutans*²⁰. Após 24 meses, a prevalência de cárie foi considerada baixa, caracterizada pela ausência de lesões cavitadas e por 83% das crianças estarem livres de cárie.

A viabilidade de *Streptococcus mutans* em escovas dentais transparentes e opacas, foi estudada por Spolidorio et al.⁹¹ em 2003. Avaliaram-se 14 escovas contaminadas em meio contendo *Streptococcus mutans*, divididas em grupos de acordo com a presença ou ausência de luz. Após a inoculação em estufa das escovas, a cada período de tempo de 0, 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas foram retiradas, uma escova opaca e uma transparente de cada grupo. Os resultados mostraram que o número de microrganismos nas escovas diminuiu com o passar do tempo para ambos os ambientes, sendo possível isolar microrganismos até 4 horas após incubação. Na estufa com iluminação a viabilidade desses microrganismos foi menos evidente nas escovas transparentes. Os autores concluíram que a superfície da escova dental apresenta condições favoráveis para colonização por *Streptococcus mutans* e que as escovas transparentes podem diminuir a viabilidade dessas bactérias.

Por meio de revisão de literatura, Banas⁹ em 2004 relatou que as pesquisas estão se desenvolvendo no sentido de se entender os mecanismos de adesão, utilização de outras formas de açúcares e interação bacteriana com o biofilme dental. O autor observou que o recente seqüenciamento genético do *Streptococcus mutans*, juntamente com o modelo de biofilme dental, promoveram a investigações sobre as bases moleculares da cárie dental, levando a novos tratamentos e protocolos preventivos para redução da incidência da doença.

Spolidório et al.⁹² em 2004, investigaram os níveis e biotipos de *Streptococcus* grupo *mutans* em crianças de 6 a 8 anos de idade de diferentes níveis socioeconômicos. Foram coletadas amostras de saliva de 200 crianças de cinco diferentes categorias socioeconômicas. As colônias obtidas foram identificadas bioquimicamente para identificação dos microrganismos. Os resultados mostraram a prevalência de *Streptococcus mutans* em 78% das colônias obtidas, seguido de 11,6% de *Streptococcus sobrinus*, 4,69% de *Streptococcus rattus*, 2,65% de *Streptococcus mutans* V, 1,83% de *Streptococcus cricetus* e 1,22% de *Streptococcus ferus*. Nas crianças que albergavam múltiplas espécies, a associação mais prevalente foi de *Streptococcus mutans* com *Streptococcus sobrinus*. Os autores observaram também que o *Streptococcus mutans* estava presente em todos os níveis socioeconômicos estudados.

A ação de soluções anti-septicas (Cepacol, Listerine, Plax, Periogard e Hipoclorito de sódio) na desinfecção de escovas dentais foi estudada por Soares et al.⁸⁷ em 2004. Foram coletadas amostras de saliva e fornecida escovas esterilizadas para escovação supervisionada. Os resultados mostraram que o nível de *Streptococcus mutans* na saliva e placa dos indivíduos foi alto, sendo que todas as escovas apresentaram resultado positivo antes da desinfecção e negativo após imersas nas soluções anti-sépticas durante 24 horas. Os autores concluíram que as escovas se tornaram altamente contaminadas após o uso e todos os agentes testados foram efetivos na sua descontaminação.

Por meio de cultura microbiana e microscopia eletrônica de varredura, Faria et al.²⁷ em 2004, avaliaram in vitro a viabilidade de *Streptococcus mutans* nas cerdas de escovas dentais em função do tempo de secagem. Após imersão das em solução contendo cepas deste microrganismo, estas foram enxaguadas em água de torneira esterilizada e divididas em 8 grupos de 5 escovas cada. As escovas do Grupo I foram incubadas imediatamente após o enxágüe, enquanto as escovas dos Grupos II a VIII foram mantidas à temperatura ambiente por 4, 8, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, respectivamente, para secagem, sendo em seguida incubadas. A partir do período de 24 horas de secagem não houve o desenvolvimento de *Streptococcus mutans*. Análise estatística mostrou que os Grupos I, II e III foram iguais entre si, levando os autores a concluir que estes microrganismos mantiveram-se viáveis nas cerdas das escovas dentais por até 8 horas.

PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a contaminação de escovas dentais por *Streptococcus* grupo *mutans* e a ocorrência de infecção cruzada por *Streptococcus mutans* após armazenagem conjunta das mesmas.

MATERIAL E MÉTODO

1 Seleção dos voluntários

Participaram da pesquisa 46 crianças de 6 a 7 anos de idade (média de 6,2 anos de idade), sendo 22 do sexo masculino (48%) e 24 do sexo feminino (52%), sem distinção de raça ou cor, matriculadas na Creche Municipal Vale do Sol Ricardo Castro, da cidade de Araraquara – SP (CAIC Vale do Sol). As crianças foram divididas em dois grupos por frequentarem salas de aula diferentes. A sala de aula A (Grupo A) possuía 22 alunos com média de idade de 6,2 anos, enquanto a sala de aula B (Grupo B) possuía 24 alunos com média de idade de 6,1 anos. Para que pudessem participar do estudo, foi solicitado aos responsáveis legais pelas crianças, o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Foram obtidas também as autorizações das Secretarias de Saúde e Educação e da direção da creche envolvida na pesquisa. Este estudo foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sendo aprovado em 19/04/2004, protocolo n° 28/03 (Anexo 2).

Todas as crianças faziam uso de escovas dentais individuais para higienização da cavidade bucal, as quais eram armazenadas em um único recipiente (Figura 1).



FIGURA 1 – Forma de acondicionamento das escovas.

Durante a pesquisa, as crianças e seus professores não receberam instruções sobre higiene bucal ou quanto a forma de limpeza e acondicionamento das escovas dentais, para que se pudesse avaliar as condições reais apresentadas pela amostra. Estas orientações foram fornecidas apenas ao final da pesquisa juntamente com os resultados encontrados.

As crianças que faziam o uso de substâncias antimicrobianas ou imunossupressoras há pelo menos três meses antes do início do estudo não foram incluídas no mesmo.

2 Coleta de dados

Com a ajuda das professoras, foram preenchidos os dados de identificação das crianças e logo após foi realizado exame clínico bucal, por meio de um único

examinador, com auxílio de espátulas de madeira, sob iluminação natural, sendo os dados anotados em fichas individuais (Anexo 3).

3 Coleta de Amostras

Foi realizada a coleta de biofilme por meio de esfregaço, com o auxílio de zaragoas esterilizadas durante 10 segundos, nas faces vestibulares e linguais de todos os dentes presentes, e dorso da língua²³.

Em seguida, as zaragoas foram depositadas no interior de tubos de ensaio devidamente codificados, contendo 1,0 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada 0,15 M, e armazenados em geladeira de isopoar para transporte em banho de gelo (entre 8 a 10°C), num período máximo de 2 horas.

Posteriormente, as crianças receberam escovas dentais, de tamanho pequeno e cerdas macias (Colgate), as quais foram utilizadas por um período de 21 dias, e recolhidas para coleta de biofilme, utilizando-se as próprias cerdas das escovas.

4 Processamento do material coletado

Todo o material coletado das superfícies dentais e dorso da língua foi levado ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP para o processamento e análise. Inicialmente os espécimes foram submetidos a 30 segundos de vibração em um agitador de tubos (Phoenix – AP 56, Série 9803), visando a obtenção de uma suspensão uniforme. Em seguida esta foi

diluída em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-4} em solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada 0,15 M.

As escovas, transportadas em campo esterilizado, tiveram suas cabeças cuidadosamente cortadas com disco diamantado em alta rotação, as quais foram imersas em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro e 4,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) a 0,15 M esterilizadas. Submetidas à agitação, obteve-se a dispersão do biofilme e uma suspensão uniforme. Em seguida foi realizada diluição conforme já descrito anteriormente para o biofilme coletado da cavidade bucal.

Para o cultivo de *Streptococcus* grupo *mutans*, alíquotas de 25 μ L de cada diluição foram inoculadas em duplicata, em placas de Petri, contendo ágar Sacarose Bacitracina - SB₂₀²⁴ (Anexo 4). A incubação foi realizada em estufa a 37°C (NOVA ÉTICA – Modelo 410/4ND, série 0759/03), por 48 horas, em microaerofilia, com placas de Petri em posição invertida, utilizando-se o método da chama de vela, em jarras de anaerobiose (PERMUTION).

5 Identificação das espécies de *Streptococcus* grupo *mutans*

5.1 Morfologia colonial

Com o auxílio de lupa estereoscópica (CarlZeiss), foi realizada a análise da morfologia das colônias, seguindo os padrões descritos para o meio SB₂₀^{6,24,102}. Baseando-se nas características pertencentes ao *Streptococcus* grupo *mutans*, foram consideradas as colônias cor branco-acinzentadas ou creme-amareladas, opacas, com

superfície granular semelhante a vidro moído, podendo apresentar ou não uma gotícula cintilante de polissacarídeo extracelular no topo (Figura 2).

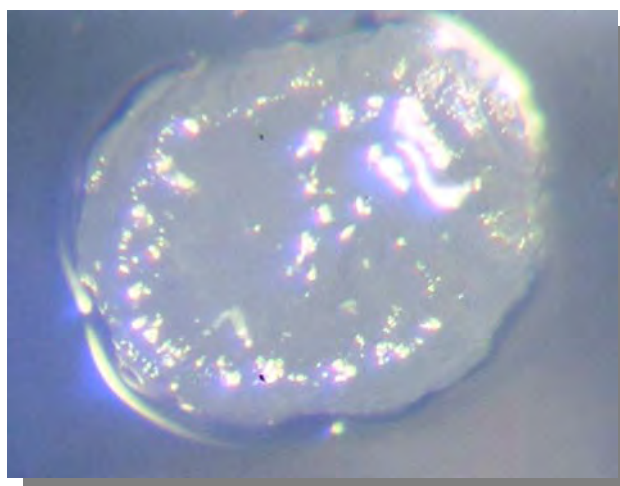


FIGURA 2: Morfologia colonial de Streptococcus grupo mutans em SB₂₀ após 48h.

Poderiam também apresentar-se firmes, não se desintegrando, e deslocando-se facilmente quando tocadas com a agulha de platina. Deveriam apresentar-se ainda circundadas por um halo incolor ou branco leitoso, visível a olho nu (Figura 3).

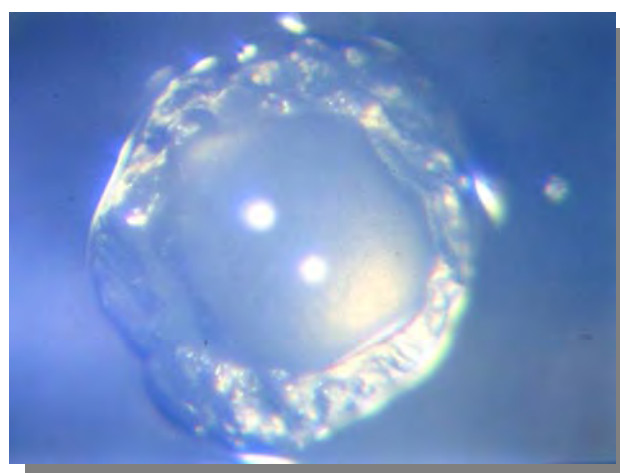


FIGURA 3: Morfologia colonial de Streptococcus grupo mutans em SB₂₀ após 48h.

Pelo menos 8 colônias com tipos morfológicos característicos, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 4,0 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion – DIFCO, Lot 33721) previamente esterilizados a 120°C por 20 minutos. A incubação foi feita a 37°C por 24 horas, em microaerofilia.

6 Identificação Bioquímica

A identificação das cepas de *Streptococcus* grupo *mutans* foi realizada por meio de provas bioquímicas, seguindo-se os critérios adotados no Manual de Bergey³⁹ (Anexo 5). Assim foram utilizadas as provas de fermentação de manitol, sorbitol, melibiose e rafinose, hidrólise de arginina, produção de peróxido de hidrogênio e sensibilidade a bacitracina. Os inóculos foram realizados sempre a partir das culturas recentes (24 horas) obtidas em BHI.

6.1 Fermentação de Carboidratos

O meio sólido base utilizado foi o Tioglicolato sem dextrose e sem indicador (DIFCO, Lot. 83568JH), acrescido de púrpura de bromocresol a 0,0016% (NUCLEAR, Lot. 86070922), e ágar na concentração final de 1,5%⁸³. Após dissolução dos componentes do meio em água destilada, foram preparadas diferentes soluções adicionando os substratos manitol (LABGUARD, Lot. 7781T13473), sorbitol (NUCLEAR, Lot. 98010044), rafinose (SIGMA, Lot. 77H0032) ou melibiose

(SIGMA, Lot. 77H0291) na proporção de 1,0%, as quais foram autoclavadas a 120°C por 20 minutos e depositadas em placas de Petri.

Para a realização desta prova bioquímica, alíquotas de 30 µL das culturas recentes identificadas morfologicamente como *Streptococcus* grupo *mutans*, foram inoculadas nos meios sólidos (anteriormente descritos) com o auxílio de um replicador de Steer, o qual tornou possível a identificação de 25 amostras em cada uma das placas de Petri. A incubação foi realizada a 37°C por 48 horas, em microaerofilia, sendo a primeira leitura realizada após 24 horas. A prova foi considerada positiva quando houve viragem do indicador de pH, identificada pela mudança da cor púrpura para a amarela (Figura 4).

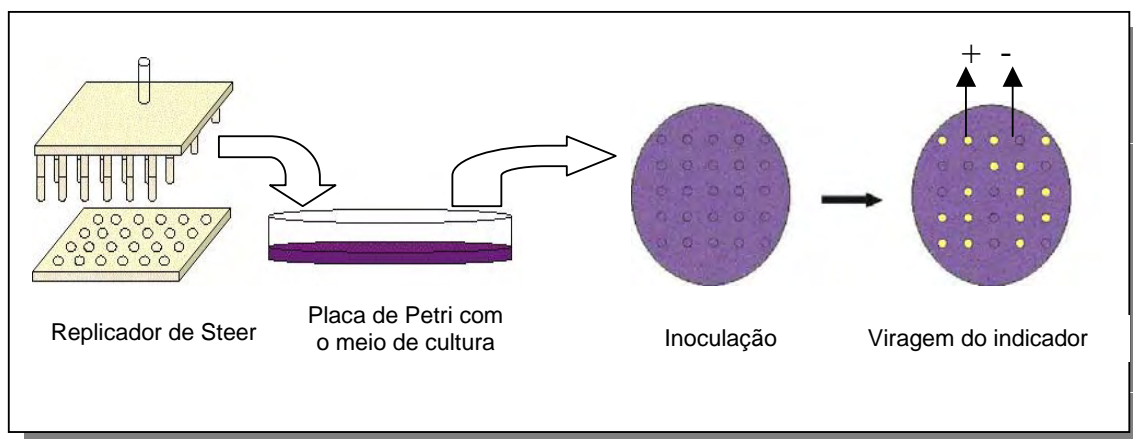


FIGURA 4 – Fermentação de carboidratos.

6.2 Hidrólise da Arginina

Esta prova baseia-se na liberação de amônia a partir da hidrólise do substrato arginina, a qual ocorre por meio da produção da enzima arginina-desaminase pelo *Streptococcus rattus*.

O teste foi realizado segundo Spolidorio⁸⁹, quando os componentes do meio (Anexo 6) foram dissolvidos em água destilada, distribuídos em tubos de ensaio em quantidade de aproximadamente de 2,0 mL e autoclavados a 120°C por 20 minutos. As cepas obtidas por culturas recentes foram semeadas, transferindo-se 0,1 mL do inóculo para os tubos, e incubadas a 37°C durante 48 horas.

Foram adicionadas a cada tubo duas gotas do reativo de Nessler (Anexo 7). A presença da cor laranja indicou reação positiva, pois a partir da hidrólise de arginina, constatou-se a presença de amônia e conseqüentemente do *Streptococcus rattus*. Quando foi observada que a coloração permaneceu amarela, a prova mostrou-se negativa.

6.3 Produção de Peróxido de Hidrogênio

Os componentes do meio para a produção de Peróxido de Hidrogênio¹⁰⁴ (Anexo 8) foram dissolvidos em água destilada. A solução foi autoclavada a 120°C por 20 minutos. A seguir, foram adicionados ao meio ainda fundido e resfriado (45°C), 5,0 mL de mistura de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada esterilizada em partes iguais, sendo o meio total aquecido a 100°C durante 15

minutos, em banho-maria. Uma solução de 0,1 g de orto-dianisidina (SIGMA, Lot. 87H5227) misturada em 5,0 mL de água destilada esterilizada, também aquecida a 100°C durante 15 minutos, foi adicionada ainda quente ao meio total, que em seguida foi distribuído em placas de Petri. A sementeira foi constituída de 3 picadas próximas, feitas com agulha de platina esterilizada, a partir de uma cultura recente das cepas em BHI. As placas foram incubadas por um período de até 48 horas a 37°C, em microaerofilia. A produção de peróxido de hidrogênio foi detectada pelo aparecimento de um halo marrom escuro ou preto em torno do crescimento bacteriano, indicando a presença de *Streptococcus sobrinus*.

6.4 Resistência a Bacitracina

Após o preparo do meio base⁸³ (Tioglicolato), foi adicionado 1,0g de manitol para cada 100 mL do meio, sendo acondicionado em recipiente adequado e autoclavado a 120°C, durante 20 minutos. Após resfriamento a cerca de 48°C, foi adicionada bacitracina (SIGMA, Lot. 77H0360), esterilizada por filtração e distribuída assepticamente em tubos esterilizados em quantidade aproximada de 2,0 mL. Após a sementeira dos mesmos, a incubação foi realizada a 37°C por até 72 horas. Para verificar a resistência do microrganismo ao antibiótico presente no meio, foi observada a mudança da cor púrpura para amarela, indicando a fermentação do manitol, quando houve crescimento do microrganismo.

7 Conservação das cepas

As cepas identificadas bioquimicamente como sendo de *Streptococcus mutans* foram repicadas em meio BHI, incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, foram centrifugadas e então, os microrganismos foram ressuspensos em BHI acrescidos de 10% de glicerol (J.T. BAKER, Lot. 080796). Os microrganismos foram estocados em três alíquotas de 1,0 mL de BHI e glicerol e congelados em freezer (Eletrolux R250) a -20°C, para posterior isolamento do DNA.

8 Identificação genética por AP-PCR

8.1 Extração do DNA

As amostras identificadas como *Streptococcus mutans* foram descongeladas, inoculadas novamente em tubos de ensaio contendo BHI, e incubadas a 37°C por 24 horas em microaerofilia. Para a obtenção do DNA, os tubos contendo BHI e microrganismos foram centrifugados (10.000 r.p.m. / 2 min – MARCONI, REVAN-centrífuga ciclo I, série 009028). Foi realizado o descarte do sobrenadante, e o precipitado (microrganismos) foi lavado em 1000 uL de solução tampão TE (10mM Tris-HCL - INVITROGEN, Lot. 1126263; 1mM EDTA - INVITROGEN, Lot. 1158795; em pH 8,0) (Anexo 9). Após agitação e nova centrifugação, os microrganismos foram ressuspensos e lavados por mais duas vezes, para então serem submetidos a um “banho de fervura” por 10 minutos em 100 uL de TE, para rompimento celular e extração de DNA. Utilizando-se micropipetas, foi realizado a

retirada do sobrenadante (60 μ L) para outro tubo tipo *ependorf*, quando foram obtidas as amostras de DNA⁶⁶ (Figura 5). Alíquotas destas amostras foram conservadas a -20°C , para posterior utilização nos experimentos de AP-PCR .

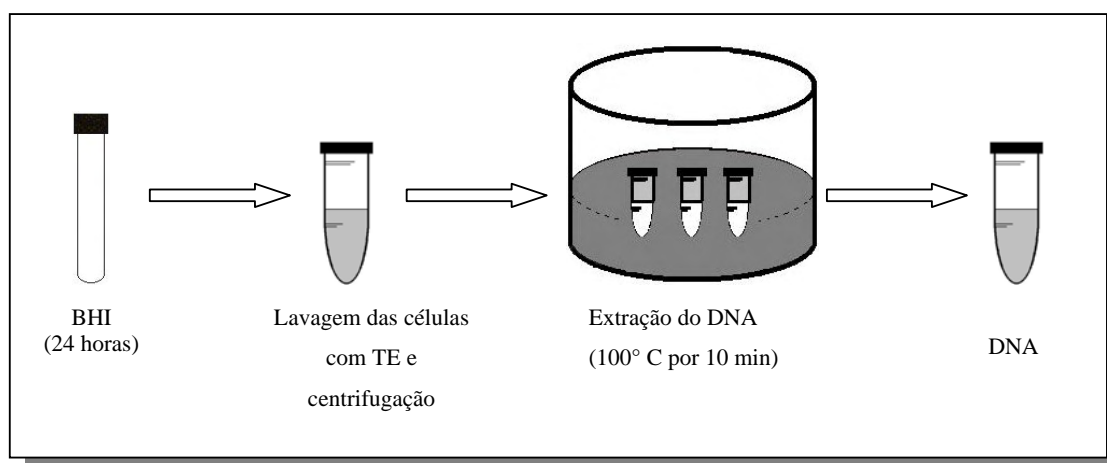


FIGURA 5 – Extração do DNA.

8.2 Padronização das condições de amplificação

Para testar a reprodutibilidade do AP-PCR, foi utilizado como controle positivo, o DNA da cepa padrão *Streptococcus mutans* (Invitrogen). Este foi amplificado, juntamente com os isolados identificados como sendo *Streptococcus mutans* e incorporados em todos os géis de análise. Como controle negativo, foram utilizadas amostras contendo água esterilizada.

A metodologia padronizada para amplificação foi realizada com um coquetel contendo 2 μ L da amostra de DNA, 15 μ L de água, 2,5 μ L de tampão (INVITROGEN - 10X PCR Buffer minus Mg_2Cl_2 , Lot. QH481), 0,4 mM de dNTP

(INVITROGEM - DNTP Mix 100 Mm, Lot. 300495), 3,5 μ L de $MgCl_2$ (INVITROGEM, Lot. QKUB2), 0,5 μ M de “*primer*” (Operon - OPA-13), e 2,5 U de Taq DNA Polymerase (INVITROGEN – Easy Taq DNA Polimerase, Lot. QBJB1a) em um volume final de 25 μ L.

Em seguida, esta mistura foi submetida a amplificação utilizando-se um termociclador (GeneAmp – PCR System 2400, Perkin Elmer). O perfil no termociclador foi de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização do “*primer*” a 36°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, concluindo a extensão a 72°C por 3 min⁸⁹ (Figura 6).

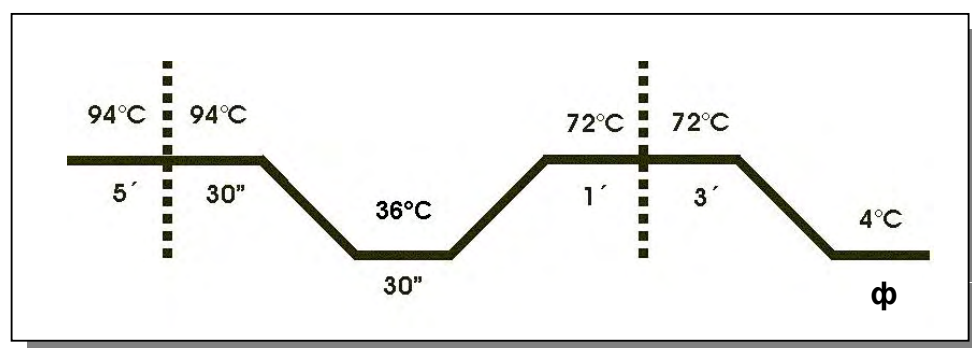


FIGURA 6 – Ciclos de termociclagem para amplificação

Os produtos resultantes das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (INVITROGEM, Lot. 1120716) (Anexo 10), em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE – pH 8,0) (Anexo 11). A corrida eletroforética foi realizada em 90 mV, por 2 horas em incubadora a -5°C (NOVA ÉTICA – Incubadora

B.O.D. 411D, série 08157/03), incluindo em cada gel um padrão de peso molecular de 1 Kb (AMERSHAM-BIOSCIENCES, Lot. 19927). Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (PHARMACIA-BIOTEC, Lot. 100388704) (Figuras 7A e 7B).

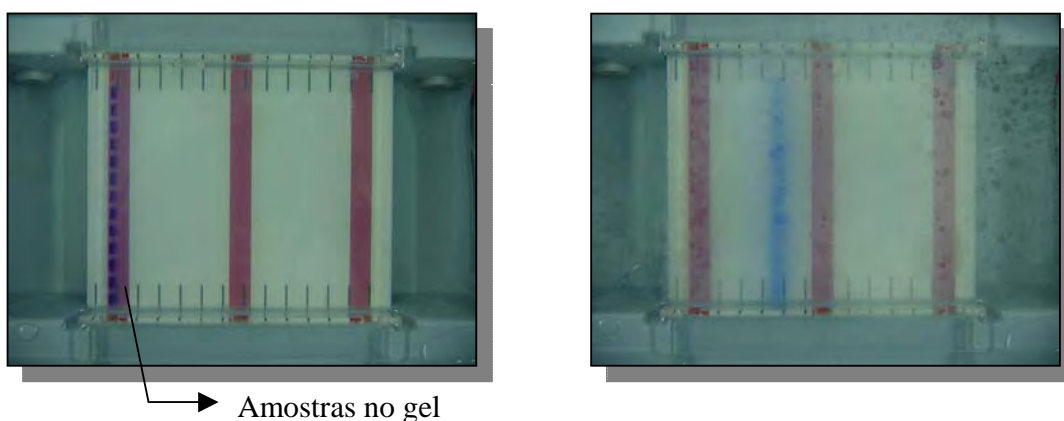


FIGURA 7A – Início da corrida em gel de agarose.

FIGURA 7B – Fim da corrida em gel de agarose.

A visualização, bem como a fotodocumentação dos produtos amplificados, foram realizadas por meio da Câmara Kodak Digital Science™ (KODAK – DC40, série EKD73200207) e do transluminador de luz ultra-violeta (LABTRADE – Ultra-Lum modelo EB-40, série 703064-00) (Figura 8). A imagem foi processada por meio do software Kodak 1D Image Analysis Software.

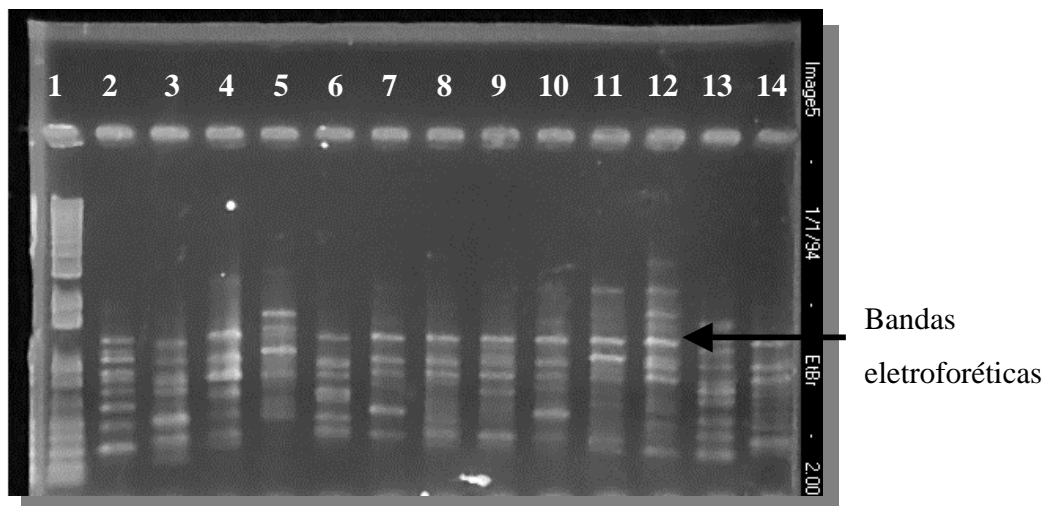


FIGURA 8 – Gel de agarose no transluminador com resultados de identificação. Linha 1 com padrão de peso molecular, Linha 2 com controle positivo e Linhas 3 a 14 com amostras de biofilme das escovas.

8.3 Análise numérica dos perfis eletroforéticos

Para a análise numérica, as imagens dos géis foram processadas por meio do software Kodak Digital Science 1D, originando bandas eletroforéticas de cada amostra em relação à linha distal de migração do corante azul de bromofenol presente na solução tampão.

As bandas eletroforéticas, representadas pelos valores de massas moleculares, tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos, os quais receberam representações 1 (um) e 0 (zero), para a presença e ausência das bandas respectivamente. O conjunto dessas informações gerou uma matriz de dados binários, a qual foi plotada no sistema NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, 1992), empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade SM

(Simple Matching Coefficient), os quais geraram uma matriz de similaridade entre as amostras.

Utilizando o mesmo sistema computacional, a matriz de similaridade foi transferida para o programa SAHN-Clustering (desempenho seqüencial e aglomeração hierárquica de grupos), e pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Mathematic Average)⁸⁶, obtendo-se os dendrogramas, os quais possibilitaram a avaliação dos graus de similaridade genotípica existente entre as amostras utilizadas neste experimento.

RESULTADOS

Por meio da realização de exame clínico, pôde-se observar a quantidade de dentes cariados, restaurados, ausentes e hígidos das crianças dos dois Grupos experimentais, sendo que 22 crianças pertenciam ao Grupo A (Quadro 1), e 24 crianças pertenciam ao Grupo B (Quadro 2).

Quadro 1: Dentes cariados, restaurados , ausentes e hígidos das crianças do Grupo A

<i>Crianças do Grupo A</i>	<i>Dentes</i>				<i>Total</i>
	Cariados	Restaurados	Ausentes	Hígidos	
1	3	1	0	18	22
2	1	1	0	20	22
3	2	0	0	20	22
4	3	2	0	17	22
5	0	0	0	22	22
6	5	2	0	17	24
7	0	1	0	19	20
8	0	0	0	22	22
9	1	0	0	21	22
10	3	3	1	15	21
11	2	2	0	18	22
12	2	1	0	19	22
13	0	0	0	24	24
14	0	1	0	21	22
15	0	2	0	20	22
16	0	0	0	20	20
17	2	2	0	18	22
18	3	0	1	20	23
19	2	0	0	20	22
20	3	1	0	18	22
21	0	0	0	22	22
22	2	0	0	20	22
Total	34	19	02	431	484

Quadro 2: Dentes cariados, restaurados , ausentes e hígidos das crianças do Grupo B

Crianças do Grupo B	Dentes				Total
	Cariados	Restaurados	Ausentes	Hígidos	
1	5	0	1	14	19
2	0	2	0	20	22
3	0	3	0	19	22
4	1	0	0	23	24
5	1	1	0	20	22
6	0	0	0	24	24
7	1	0	0	19	20
8	2	1	1	18	21
9	0	2	0	20	22
10	0	0	0	22	22
11	0	0	0	22	22
12	3	0	0	19	22
13	1	0	0	21	22
14	0	2	0	20	22
15	0	0	0	20	20
16	4	0	1	17	21
17	2	0	0	20	22
18	3	0	0	19	22
19	0	0	0	22	22
20	0	2	0	22	24
21	2	0	0	22	24
22	4	0	0	18	22
23	0	0	0	24	24
24	3	0	0	19	22
Total	32	13	03	484	529

Como resultado do processamento do material coletado da cavidade bucal, pôde-se observar que em apenas 37 crianças (80,43%) houve crescimento de *Streptococcus grupo mutans*, sendo 19 crianças pertencentes ao Grupo A (86,36%), e 18 crianças pertencentes ao Grupo B (75%).

Das amostras coletadas da cavidade bucal das crianças de ambos os grupos, identificaram-se 222 colônias de *Streptococcus* grupo *mutans* sendo 154 colônias de *Streptococcus mutans* (69,37%), 29 colônias de *Streptococcus sobrinus* (13,06%) e 39 colônias de outras espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* (17,56%) (Gráfico 1).

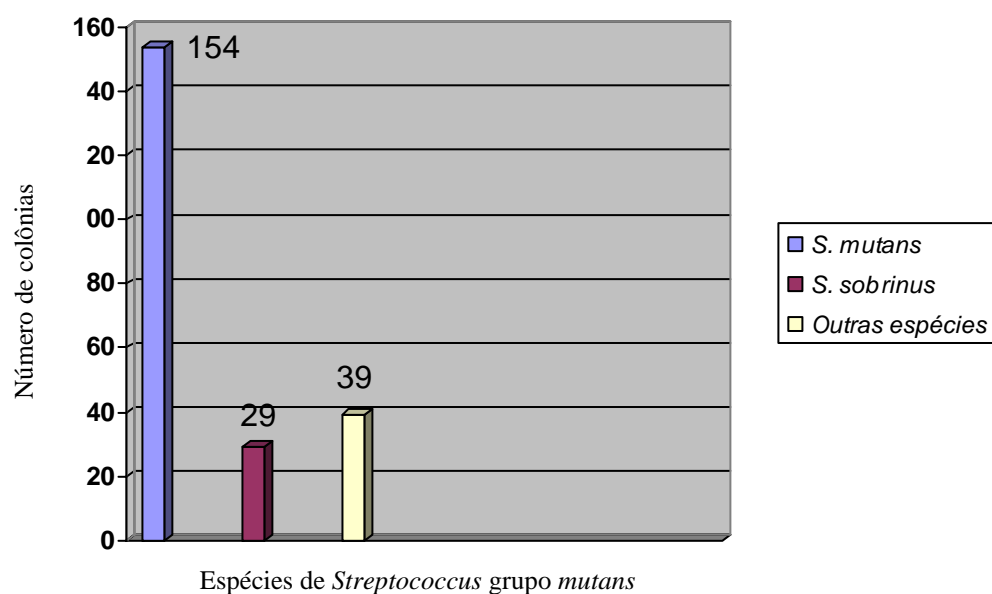


Gráfico 1: Número de espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* encontradas na cavidade bucal das crianças dos Grupos A e B

No Quadro 3 estão representadas as espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* encontradas na cavidade bucal de cada criança do Grupo A.

Quadro 3: Espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* encontradas na cavidade bucal de cada criança do Grupo A

Crianças do Grupo A	Espécies de <i>Streptococcus</i> grupo <i>mutans</i>			Total
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	Outras espécies	
1	3	2	0	5
2	5	0	2	7
3	4	2	1	7
4	6	0	0	6
5	5	1	0	6
6	5	0	1	6
7	5	1	0	6
8	5	0	2	7
9	6	0	0	6
10	4	2	2	8
11	4	0	2	6
12	0	0	0	0*
13	0	0	0	0*
14	5	0	1	6
15	4	1	0	5
16	5	2	0	7
17	3	0	4	7
18	5	0	0	5
19	3	1	2	6
20	4	0	0	4
21	0	0	0	0*
22	5	0	1	6
Total	86	12	18	116

* Amostras que não apresentaram crescimento de *Streptococcus* grupo *mutans*

No Quadro 4 estão representadas as espécies de *Streptococcus* grupo *mutans* encontradas na cavidade bucal de cada criança do Grupo B.

Quadro 4: Espécies de *Streptococcus grupo mutans* encontradas na cavidade bucal de cada criança do Grupo B

Crianças do Grupo B	Espécies de <i>Streptococcus grupo mutans</i>			Total
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	Outras espécies	
1	4	3	2	9
2	0	0	0	0*
3	4	0	1	5
4	0	0	0	0*
5	3	2	1	6
6	0	0	0	0*
7	3	0	2	5
8	4	0	1	5
9	3	2	0	5
10	2	1	5	8
11	4	0	0	4
12	4	0	3	7
13	0	0	0	0*
14	5	2	0	7
15	3	0	2	5
16	5	0	0	5
17	0	0	0	0*
18	2	4	2	8
19	5	0	0	5
20	4	2	0	6
21	5	0	0	5
22	4	0	1	5
23	4	1	1	6
24	0	0	0	0*
Total	68	17	21	106

* Amostras que não apresentaram crescimento de *Streptococcus grupo mutans*

Após o processamento das escovas dentais, pôde-se observar crescimento de *Streptococcus grupo mutans* em 14 delas (37,83%), sendo que 6 escovas (27,27%) pertenciam as crianças do Grupo A, e 8 (33,33%) às crianças do Grupo B. Nas demais escovas, não houve crescimento destes microrganismos.

Os testes bioquímicos identificaram 112 amostras de *Streptococcus grupo mutans*, sendo 94 colônias de *Streptococcus mutans*, (83,92%), 12 colônias de *Streptococcus sobrinus* (10,71%) e 06 colônias de outras espécies de *Streptococcus grupo mutans* (5,35%) (Gráfico 2).

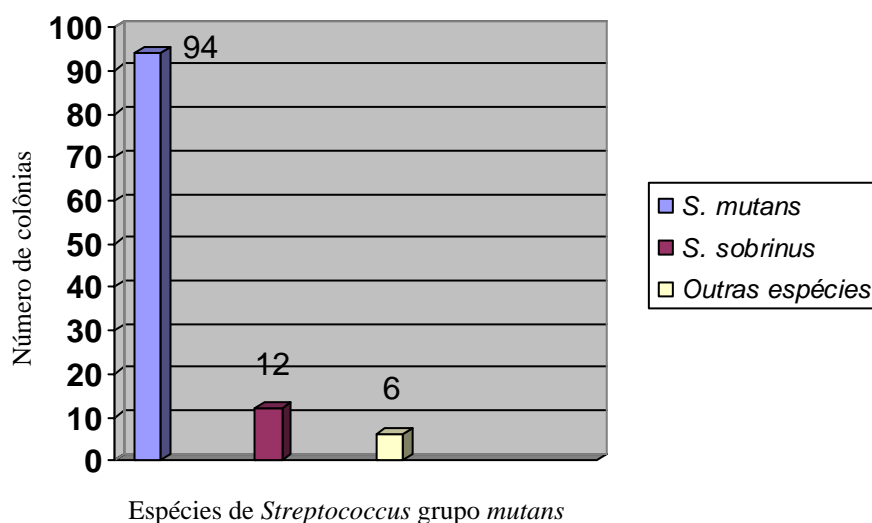


Gráfico 2: Número de espécies de *Streptococcus* grupo mutans encontradas nas escovas dentais coletadas dos Grupos A e B

No Quadro 5 estão representadas as espécies de *Streptococcus* grupo mutans encontradas nas escovas dentais das crianças do Grupo A.

Quadro 5 : Espécies de *Streptococcus* grupo mutans encontradas nas escovas dentais de cada criança do Grupo A

Crianças do Grupo A	Espécies de <i>Streptococcus</i> grupo mutans			Total
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	Outras espécies	
1	8	1	0	9
3	9	0	0	9
6	8	1	0	9
8	6	0	2	8
13	8	1	1	10
20	7	2	0	9
Total	46	5	3	54

No Quadro 6 estão representadas as espécies de *Streptococcus grupo mutans* encontradas nas escovas dentais das crianças do Grupo B.

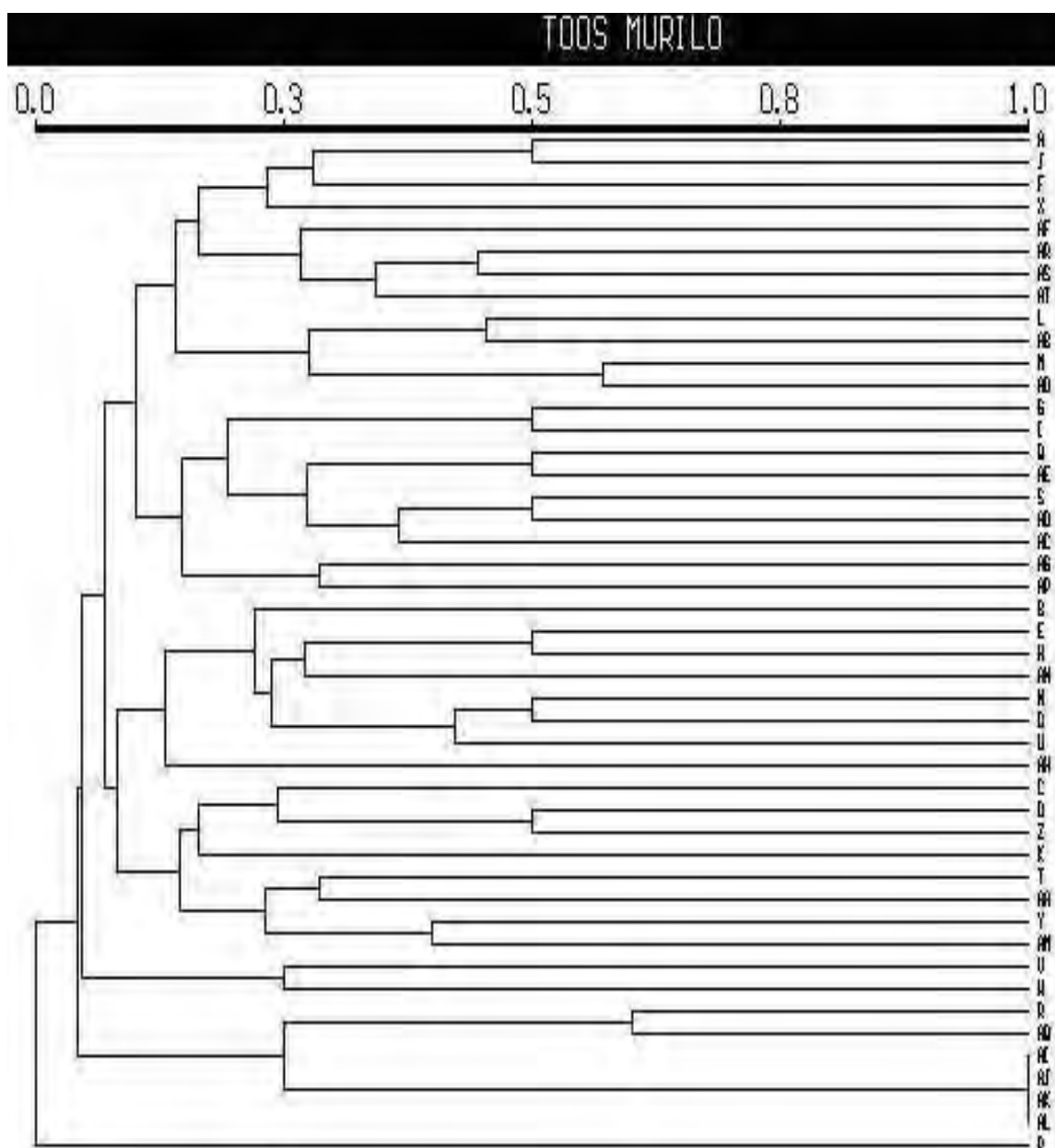
Quadro 6 : Espécies de *Streptococcus grupo mutans* encontradas nas escovas dentais de cada criança do Grupo B

Crianças do Grupo B	Espécies de <i>Streptococcus grupo mutans</i>			Total
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	Outras espécies	
1	5	0	0	5
2	6	0	1	7
4	5	1	0	6
8	7	0	0	7
10	6	2	1	9
11	7	2	0	9
21	7	0	1	8
23	5	2	0	7
Total	48	7	3	58

Com o propósito de verificar a possibilidade de transmissão horizontal de *Streptococcus mutans* entre as escovas dentais armazenadas em um mesmo recipiente em cada sala da creche, comparou-se o perfil eletroforético das diferentes amostras detectadas nas escovas. Por meio da técnica de AP-PCR, pode-se construir dendrogramas representativos dos diferentes genótipos de *Streptococcus mutans* detectados para cada escova dental das crianças pertencentes aos Grupos A e B, representados nas Figuras 9 e 10 respectivamente.

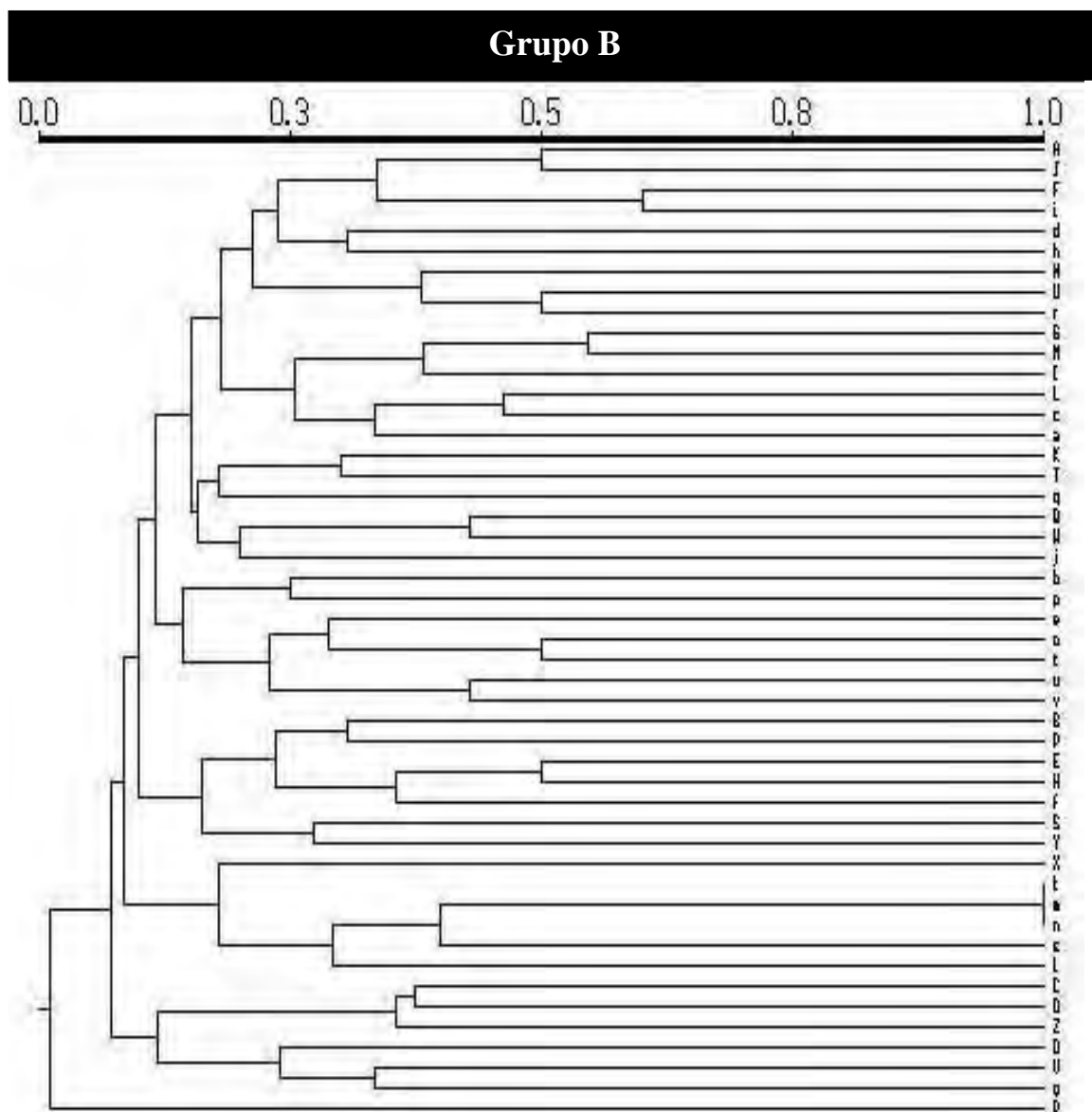
FIGURA 9: Variabilidade genética (OPA-13) entre *Streptococcus mutans* provenientes de escovas dentais das crianças do Grupo A. Dendrograma UPGMA elaborado a partir da matriz de similaridade S_{SM} .

Grupo A



No Grupo A foram identificadas 43 linhagens de *Streptococcus mutans*, sendo 1 delas representada por 4 isolados, (isolados AC, AK, AS e AL), não indicando transmissão, pois pertenciam a mesma escova dental (Gráfico 3).

FIGURA 9: Variabilidade genética (OPA-13) entre *Streptococcus mutans* provenientes de escovas dentais das crianças do Grupo A. Dendrograma UPGMA elaborado a partir da matriz de similaridade S_{SM} .



No Grupo B foram identificadas 46 linhagens de *Streptococcus mutans*, sendo 1 delas representada por 3 isolados (isolados t, h e s), não indicando transmissão, pois também pertenciam a mesma escova dental.

Após análise dos dendrogramas, pôde-se observar que nenhuma das escovas armazenadas em um mesmo recipiente, apresentaram linhagens idênticas de *Streptococcus mutans* entre si, não indicando portanto, que houve transmissão deste microrganismo.

O padrão de similaridade entre as diferentes linhagens detectadas nas escovas, foi baixo, sendo menor de 50% na maioria dos casos.

DISCUSSÃO

Infecções na cavidade bucal como a cárie dental e a doença periodontal são provavelmente as mais comuns e prevalentes infecções bacterianas em seres humanos, as quais, diferente de outras doenças de origem microbiana, resultam de interações complexas entre bactérias, hospedeiro e dieta^{37,38,40,79,84,85,94}.

Após revisão sistemática da literatura, Rosa e Sanches⁷⁹ (2000) e Tanzer⁹⁴ et al. (2001), observaram que os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são as espécies mais comumente relacionadas à iniciação e progressão da lesão de cárie dental, sendo o controle da infecção e transmissão destes microrganismos, fundamental para a prevenção desta doença.

Estudos científicos também encontraram que o *Streptococcus mutans* tem seus níveis percentuais fortemente associados ao desenvolvimento da lesão de cárie em crianças^{2,37,64,75,101}, assim como associação positiva entre o número destes microrganismos encontrado em mães e o desenvolvimento de lesões de cárie em seus filhos^{2,101}.

Considerando a mãe como principal fonte de infecção de *Streptococcus mutans* para seus filhos^{4,15,16,18,20,23,24,36,38,47,48,50,55,72,79,84,90,95,103}, programas preventivos vêm sendo desenvolvidos em busca da redução dos microrganismos em suas cavidades bucais, para impedir ou diminuir a chance de transmissão de *Streptococcus mutans* para suas crianças^{3,11,12,22,23,30,31,50,53,58,95,98,99}.

Deve-se lembrar porém, que as mães em geral, apresentam variedade maior de *Streptococcus mutans* do que aquelas detectadas nas crianças, o que

sugere, que certas cepas maternas não se implantam em seus filhos no momento da aquisição inicial. A existência de grande diversidade genotípica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência^{73,93}, assim como de diferentes origens^{48,63}.

As fontes de infecção externas à família também devem ser consideradas e investigadas, pois nem todas as cepas presentes nas crianças se originam de suas mães^{6,7,19,49,60,63,69,76,77,88}. Estudos realizados por meio de tipagem fenotípica e/ou genotípica têm mostrado que cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* transmitidas às crianças, podem ser provenientes das mães principalmente, ou de outros indivíduos que mantêm contato e convivem no mesmo ambiente com a criança durante suas atividades e hábitos diários^{55,63}.

De acordo com van Houte e Green¹⁰⁰ (1974) e Aaltonen e Tenovuol¹ (1994), os *Streptococcus* grupo *mutans* não são facilmente transmitidos, além de sua estabilidade na cavidade bucal ser modulada por um grupo complexo de fatores, incluindo o número de dentes irrompidos. Níveis de *Streptococcus* grupo *mutans* na saliva das mães^{4,103}, estado imunológico da criança^{1,79}, presença de lesão de cárie ou hipoplasia de esmalte^{72,103} e consumo de sacarose^{7,12,31} também contribuem para este processo.

Além da possibilidade de contaminação, o desenvolvimento de lesão de cárie também está diretamente relacionado ao aumento nos níveis salivares de *Streptococcus* grupo *mutans* e do seu estabelecimento precoce na cavidade bucal^{32,51}. Estudos demonstram que a aquisição precoce de *Streptococcus mutans*

tornam as crianças, indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de lesões de cárie, sendo que o número de lesões é proporcional ao número de microrganismos presentes na cavidade bucal^{3,8,51,62,64,75}. Mattos-Graner et al.⁶⁴ em 2001, observaram que a redução dos níveis salivares dessas bactérias em crianças, estava acompanhada ao não desenvolvimento da doença.

A coleta de material da cavidade bucal para a realização destes estudos, pode ser feita por meio de saliva, biofilme ou de ambos, os quais fornecem um *pool* de microrganismos representativos da microbiota da cavidade bucal. A coleta de saliva, normalmente visa analisar quantitativamente os microrganismos da cavidade bucal, enquanto a coleta de biofilme pode ser realizada tanto para análise quantitativa quanto qualitativa dos microrganismos^{35,70}. Neste estudo foi realizada a coleta de um *pool* de microrganismos presentes na saliva e biofilme dental⁶⁵, o qual de acordo com Gronroos et al.³⁵ (2000), permite a análise qualitativa dos microrganismos da cavidade bucal.

A saliva representa a principal fonte para o isolamento de microrganismos cariogênicos, oferecendo facilidade de coleta e manipulação das amostras, além de ser considerada como representativa de todos os nichos da cavidade bucal^{51,70}. Além da coleta de saliva, Alaluusua et al.³ (1989), também analisaram o biofilme dental de 47 crianças e observaram que o número de superfícies contaminadas aumentou com os níveis salivares de *Streptococcus mutans*, assim como com a experiência de cárie.

De acordo com os dados obtidos a partir de exame clínico e testes bioquímicos realizados neste estudo, pôde-se observar que as crianças

apresentaram prevalência da espécie *Streptococcus mutans* (Gráfico 1, Quadros 3 e 4), embora apresentassem poucas lesões de cárie na cavidade bucal (Quadros 1 e 2). Estudos observados na literatura também demonstraram que o *Streptococcus mutans* foi a espécie mais prevalente na cavidade bucal^{7,51,57,61,65,68,74,93,94}. Marchant et al.⁶¹ em 2001, encontraram predominância de *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Lactobacillus spp.* em lesões de cárie. Embora Fujiwara³² (1991), tenha relatado que a baixa prevalência de *Streptococcus grupo mutans* na cavidade bucal esteja fortemente relacionada à ausência de manifestações da lesão de cárie, Mattos-Graner et al.⁶⁴ (2001) afirmaram que os *Streptococcus grupo mutans* podem ser detectados em altos níveis até mesmo nesta situação. Os dados coletados neste estudo, demonstraram que em alguns casos, não foi possível o isolamento do microrganismo (Quadros 3 e 4).

Para estudar a possibilidade de contaminação das escovas dentais e posteriormente a contaminação entre as mesmas, utilizou-se coleta de biofilme dental das cerdas das escovas de cada criança após 21 dias de uso. Durante o período experimental, as escovas foram armazenadas em um mesmo recipiente sem proteção de suas cerdas (Figura 1). Após estudo sobre a forma de acondicionamento de escovas dentais em creches, Brandão et al.¹⁷ (2001), observaram que 46% das escovas eram acondicionadas com as cerdas em contato direto umas com as outras. Macari et al.⁶⁰ (2001) sugeriram possível contaminação cruzada dependendo da forma de armazenamento das escovas dentais. Culturas positivas de *Streptococcus mutans* em 86% das escovas estudadas, foram observadas por Leal et al.⁵⁴ (2003). Coletas de biofilme em

escovas dentais também foram realizadas por Okada et al.⁷¹ (2002) e Barbosa et al.¹⁰ (2003).

Por meio da realização de testes bioquímicos^{5,6,12,14,15,21,24,32,56,57,65,69}, pode-se identificar os microrganismos coletados das escovas dentais utilizadas neste estudo, indicando novamente que o *Streptococcus mutans* foi a espécie bacteriana mais prevalente em relação às demais espécies pertencentes ao grupo *mutans* (Gráfico 2, Quadros 5 e 6).

Estudos têm demonstrado que mesmo após a limpeza de escovas dentais em água de torneira, ocorre o crescimento do *Streptococcus* grupo *mutans*^{10,60}. Porém em apenas 14 escovas dentais utilizadas neste estudo (37,83%) pode-se isolar este microrganismo. Este fato pode ter ocorrido em função da vigorosa fricção das escovas durante seu enxágüe e sua secagem em toalhas de tecido, realizadas pelas crianças. Devemos considerar também que as crianças possuíam baixa prevalência de lesões de cárie (Quadros 1 e 2) e conseqüentemente baixo número de microrganismos (Quadros 3 e 4). Após 24 horas de secagem de cerdas de escovas dentais contaminadas por *Streptococcus mutans*, Faria et al.²⁷ (2004) não observaram desenvolvimento do microrganismo. Barbosa et al.¹⁰ (2003) observaram que em 76,9% das escovas borrifadas com água de torneira esterelizada, houve crescimento de *Streptococcus* grupo *mutans*.

Utilizando diferentes recursos para evitar a contaminação cruzada, Carvalho et al.¹⁹ (2003) observaram que a mesma eficiência para desinfecção de brinquedos foi encontrada, após o uso de glutaraldeído de sódio a 2%, álcool a 70% e sabão de coco, enquanto Barbosa et al.¹⁰ (2003) notaram ausência de

colonização apenas após o uso de guclonato de clorexidina a 0,12 %. De acordo com Gronroos et al.³⁵ (2000), quanto maior o número de isolados, maior possibilidade de se obter dados mais precisos.

Deve-se considerar também que para o desenvolvimento da fase laboratorial, o transporte e processamento das escovas dentais foram realizados de acordo com o tempo e metodologia adequados. A investigação de populações microbianas por técnicas de cultura, ou por demais técnicas convencionais, é freqüentemente limitada, devido aos microrganismos necessitarem de se desenvolver em laboratório para que possam ser identificados^{5,45,56,82,96,105}.

Considerando a transmissibilidade direta de microrganismos da microbiota bucal em humanos, e as possibilidades direta e indireta (fômites)⁴⁹ da viabilidade de cepas de *Streptococcus mutans* sobreviverem em maçanetas, telefones, mesas, tubos de creme dentais e, em especial, escovas dentais^{49,91}, torna-se muito importante a observação e preocupação com as características físicas, de utilização e manutenção destes objetos.

Köhler e Bratthall⁴⁹ (1978) observaram que embora colônias de *Streptococcus mutans* poderiam ser obtidas de colheres após 48 horas de contaminação salivar, a viabilidade de colônias para cultura diminuiu consideravelmente após 7 horas da contaminação.

Após a realização dos testes bioquímicos para a identificação de *Streptococcus mutans*, procurou-se constatar a possibilidade de sua transmissão horizontal através de escovas dentais por meio das análises da AP-PCR e de agrupamento.

Para este fim, várias são as técnicas que podem ser utilizadas para verificar a semelhança de espécies bacterianas isoladas de diferentes indivíduos^{4,6,7,14,24,34,35,41,42,44,52,53,55,81,82,83,96}. Inicialmente, para a confirmação do papel da mãe como principal representante da fonte de transmissão de *Streptococcus mutans* para a colonização inicial da cavidade bucal de bebês foi empregada a bacteriocinotipagem¹⁶, a qual apresentou deficiência na sensibilidade para identificar todas as cepas presentes em um mesmo estudo. A partir da década de 80, métodos moleculares com maior capacidade discriminatória e confiabilidade, foram aplicados em estudos da diversidade genética de espécies bacterianas da cavidade bucal^{4,6,7,13,24,33,34,35,43,45,52,53,55,81,82,96,97,105}.

A técnica molecular por PCR apresenta limitações peculiares, pois para que um microrganismo seja identificado, é necessário o prévio conhecimento de seu seqüenciamento genético, para que *primers* com seqüência de nucleotídeos sejam sintetizados⁸¹. Além disso, quando comparado a técnicas bioquímicas convencionais, é uma técnica complexa, onde há a necessidade de equipamentos e materiais mais sofisticados e de custo mais elevado.

A presença de bandas quando se utiliza a técnica PCR não pode ser considerada como comprovação da presença de bactérias viáveis. Isto ocorre, pois o DNA dos microrganismos mortos, que tiveram parte de seu DNA preservado, podem ser capturados pelos reagentes do PCR, e serem amplificados em bandas pela eletroforese. Por outro lado, a não evidênciação de bandas, pode inferir com alto grau de precisão a ausência de espécie bacteriana^{56,105}.

Embora alguns estudos relatem não haver diferença significativa entre a técnica de PCR e testes bioquímicos para identificação de microrganismos, a técnica de PCR é mais efetiva e rápida¹⁰⁵.

Desta forma as técnicas moleculares estão sendo muito utilizadas, sendo a AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Primers Arbitrários) amplamente empregada na detecção da diversidade genotípica de patógenos da cavidade bucal. A principal vantagem desta técnica é que não há necessidade de conhecimento prévio da seqüência de DNA da espécie bacteriana em estudo^{26,35,46,47,48,56,63,67,78,81,90}, pois utiliza *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a seqüência de reação de amplificação.

Para a realização deste estudo, utilizou-se a técnica AP-PCR para a análise genotípica dos microrganismos encontrados a partir de culturas obtidas de amostras coletadas de escovas dentais que pertenciam às crianças da mesma sala de aula de uma creche. Assim, pôde-se observar que as imagens dos géis originaram bandas eletroforéticas de cada amostra, representadas pelos valores de massas moleculares, as quais, tiveram suas distâncias de migração convertidas nos valores numéricos, representados por 1 (um) e 0 (zero), os quais indicaram a presença e ausência das bandas, respectivamente. Por meio de matriz de similaridade, obteve-se dendrogramas (Figuras 9 e 10), os quais possibilitaram a avaliação dos graus de similaridade existente entre as amostras utilizadas neste experimento.

Mattos-Graner et al.⁶³ (2001) encontraram que duas crianças que compartilhavam o mesmo ambiente, de uma creche da cidade de Piracicaba (SP),

albergavam um genótipo idêntico de *Streptococcus mutans*, ressaltando a possível transmissão horizontal como fonte de infecção. Nie et al⁶⁹ (2002) encontraram a ocorrência de genótipos similares de *Streptococcus mutans* em casais que viviam juntos a pelo menos dois anos, sugerindo também possível transmissão cruzada deste microrganismo.

Porém da mesma maneira que Klein⁴⁷ (2003) e Emídio²⁶ (2003), os quais não verificaram transmissão horizontal entre crianças que compartilhavam o mesmo ambiente na creche, neste estudo não foram encontrados genótipos de *Streptococcus mutans* similares em diferentes escovas dentais. No Grupo A, foram identificadas 43 linhagens de *Streptococcus mutans*, sendo 42 diferentes entre si, apenas 4 semelhantes. No Grupo B, foram identificadas 46 linhagens de *Streptococcus mutans*, sendo 45 diferentes, apenas 3 semelhantes entre si (Gráfico 3). As linhagens idênticas encontrados para o Grupo A (Figura 9) e Grupo B (Figura 10) pertenciam à mesma escova dental. Assim pode-se observar que nenhuma das escovas armazenadas em um mesmo recipiente, apresentaram genótipos idênticos entre si, não indicando portanto, transmissão horizontal de *Streptococcus mutans*.

De acordo com Yano et al.¹⁰⁵ em 2002, alguns genótipos pertencentes às crianças, podem não ter sido detectados nas escovas, possivelmente por estarem presentes em níveis abaixo do limite de detecção por cultura.

Apesar de nosso estudo não ter evidenciado a contaminação cruzada por *Streptococcus mutans* resultante da armazenagem conjunta de escovas dentais, compreendemos que é necessário a implantação de programas educativos e

preventivos sobre a forma de acondicionamento das mesmas em creches, já que não existe uma padronização para este procedimento^{10,17,25,27,54,60,87,91}. Devemos considerar também que o hábito de escovação diária está sendo amplamente difundido e praticado em creches e muitas vezes não há informações suficientes para sua correta realização. Freire e Melo³¹ (1996), após estudo em 54 creches de Goiânia (GO), observaram que 91% delas realizavam escovação diária. Existem ainda outras bactérias, vírus e fungos, que podem ser transmitidos pelas escovas, causando doenças nas crianças.

A prevenção da cárie dental começa pelos cuidados oferecidos às mães, antes mesmo da erupção da dentição decídua em seus filhos, uma vez que elas são não apenas a principal fonte de *Streptococcus grupo mutans*, como também o modelo de comportamento para seus filhos.

Desta forma um programa deve buscar a modificação do comportamento das mães em relação aos cuidados com a saúde bucal, uma vez que os hábitos alimentares e dietéticos das crianças durante a infância é influenciado pelos hábitos dos pais, sendo adotados e mantidos durante toda a vida do indivíduo^{2,22,31,50,103}.

As creches também devem ser alvo de programas preventivos que informem sobre transmissão de microrganismos, além de reforçar aspectos de higiene e saúde geral. Nestes locais, as crianças passam boa parte de seu tempo, aprendem e estão em contato com outras crianças e adultos capazes de transmitir doenças^{26,48,63}. Alguns estudos observaram melhores condições de saúde bucal em crianças das instituições que promoviam cuidados com a saúde, sugerindo que a

escola constitui um pólo de informação e extensão de cuidados à criança e a família^{12,99}.

CONCLUSÃO

Com base nas análises dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O *Streptococcus mutans* foi a espécie mais prevalente tanto na cavidade bucal quanto nas escovas dentais das crianças.
- O armazenamento conjunto das escovas dentais com contato direto entre as cerdas, não demonstrou ser um veículo para a transmissão horizontal de *Streptococcus mutans*.

REFERÊNCIAS*

1. AALTONEN, A. S.; TENOVUO, J. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v. 16, n. 2, p. 110-116, Mar./Apr. 1994.
2. ALALUUSA, S. Transmission of mutans streptococci. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v. 87, n. 4, p. 441-447, 1991.
3. ALALUUSUA, S.; MYLLÄRNIEMI, S.; KALLIO, M. *Streptococcus mutans* Infection Level and Caries in a Group of 5-Year-Old Children. **Caries Res.**, Basel, v. 23, n. 3, p. 190-194, 1989.
4. ALALUUSUA, S. et al. Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 167-173, Feb. 1996.
5. ALLAKER, R. P. et al. Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of the spaP gene in teeth rendered caries free. **J. Dent.**, Guildford, v. 26, n. 5-6, p. 443-445, Jul./Aug. 1998.
6. AZEVEDO, R.V.P. **O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans".**

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

1988. 110 f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
7. AZEVEDO, R. V. P.; ZELANTE, F. Streptococci of the mutans group: Confirmation of intrafamilial transmission by mutacin typing. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 27-34, 1994.
 8. AZEVEDO, R. V. P. et al. Estreptococos do grupo mutans: Determinação do risco a cárie e da prevalência das espécies na saliva de crianças – método da espátula. **Rev. Odontop.**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 91-96, abr./maio/jun. 1993.
 9. BANAS, J. A. Virulence properties of Streptococcus mutans. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 9, n. 1, p. 1267-1277, May 2004.
 10. BARBOSA, B. M. C. et al. Y. Pacientes especiais: avaliação da contaminação microbiana e de métodos de desinfecção de escovas dentais. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, suppl., p. 180, set. 2003.
 11. BARROS, S. G. et al. Contribuição ao estudo da cárie dentária em crianças de 0-30 meses. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 215-222, jul./set. 2001.

12. BATTELINO, L. J. et al. Evaluación Del estado de salud bucodental em preescolares: estudio epidemiológico longitudinal (1993-1994), Córdoba, Argentina. **Rev. Saúde Pública.**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 272-281, jun. 1997.
13. BECKER, M. R. et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n. 3, p. 1001-1009, Mar. 2002.
14. BEIGHTON, D.; RUSSELL, R. R. B.; WHILEY, R. A. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n. 3, p. 174-178, 1991.
15. BERKOWITZ, R. J.; JONES, P. Mouth-to-mouth transmisión of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. **Arch. Oral Bio.**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 377-379, 1985.
16. BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 20, n.3, p. 171-174, Mar. 1975.
17. BRANDÃO, L. M. S.; COELHO, R. S.; SILVEIRA, J. L. G. C. Avaliação do uso e acondicionamento de escovas dentárias em creches. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 1, n. 2, p. 37-41, maio/ago. 2001.

18. BROWN, J. P.; JUNNER, C.; LIEW, V. A study of *Streptococcus mutans* levels in both infants with bottle caries and their mothers. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 30, n. 2, p. 96-98, Apr. 1985.
19. CARVALHO, A. S. et al. Avaliação da transmissão cruzada de microrganismos orais através de brinquedos em consultório odontopediátrico. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, suppl., p. 131, set. 2003.
20. CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infection. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 72, n. 1, p. 37-45, Jan. 1993.
21. CAUFIELD, P. W. et al. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: Evidence for a discrete window of infection. **Infect. Immun.**, Washington, v. 8, n. 7, p. 4018-4023, July 2000.
22. COUTO, G. B. L. et al. Comparações clínico-anamnésicas e microbiológicas entre mães e filhos relacionadas com a transmissão da doença cárie. **An. Fac. Odont. Univ. Fed. Pernambuco**, Recife, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2000.
23. DASANAYAKE, A. P. et al. Transmission of mutans streptococci to infants following short term application of Na iodine-NaF solution to mother's

- dentition. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 21, n.3, p. 136-142, June 1993.
24. DAVEY, A. L.; ROGERS, A. H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 453-460, 1984.
25. DUARTE, C. A.; MARCONDES, P. C.; RAYEL, A. T. Transmissibilidade da microbiota bucal em humanos: repercussão sobre o dente e o periodonto – revisão de literatuta. **Rev. Periodontia**, Rio de Janeiro, v.4, n.1, p.211-2116, jan./jun. 1995.
26. EMÍDIO, T. C. S. Investigação genotípica de isolados de *Streptococcus mutans* provenientes de crianças que freqüentam creches. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, supl. 2, p. 62, set. 2003.
27. FARIA, G. et al. Viabilidade de *Streptococcus mutans* nas cerdas de escovas dentais, em função do tempo de secagem. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.18, suppl., p.216, Sept. 2004.
28. FLÓRIO, F. M. et al. Precocidade da aquisição de estreptococos grupo *mutans*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, suppl., p. 24, set. 2002.

29. FLÓRIO, F. M. et al. Influência da época de colonização por estreptococos grupo mutans na incidência de cárie dentária em crianças. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, suppl., p. 181, set. 2003.
30. FONSECA, F. B. D. et al. Levantamento sobre erupção precoce dos primeiros molares permanentes em crianças abaixo de 6 anos de idade e sua prevalência de cárie. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 35-40, jan./jun. 2001.
31. FREIRE, M. C. M.; MELO, R. B. Assistência à saúde bucal nas creches de Goiânia. **ROBRAC: Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 6, n. 18, p. 4-8, jun. 1996.
32. FUJIWARA, T. et al. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, Copenhagen, v. 19, n.3, p. 151-154, June 1991.
33. GALAVIZ, L. A. A.; MEDINA, M. D. C. A.; GARCÍA, I. C. E. Detection of potentially cariogenic strains of streptococcus mutans using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Birmingham, v. 27, n. 1, p.47-52, Fall 2002.

34. GARNIER, F. et al. Identification of clinical relevant viridans group streptococci to the species level by pcr. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 9, p. 2337-2341, Sept. 1997.
35. GRONROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Res.**, Basel, v. 34, n. 6, p. 474-480, Nov./Dec. 2000.
36. GRONROOS, L. et al. Mutacin production by streptococcus mutans may be promote trasnmission of bacteria mother to child. **Infect. Immun.** Washington, v. 66, n. 6, p. 2595-2600, June 1998.
37. HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenecity of Streptococcus mutans. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 44, n. 2, p. 331-384, June 1980.
38. HANADA, N. Current understanding of the cause of dental caries. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tókió, n. 53, v. 1, p. 1-5, Feb. 2000.
39. HARDIE, J. M. Oral *streptococci*. In: BERGEY, D.H. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, cap. 12, p. 1054-63.

40. HARDIE, J. M. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. **Br. Dent. J.**, London, v. 172, n. 11, p. 271-278, Apr. 1992.
41. HILLMAN, J. D.; YAPHE, B. I.; JOHNSON, K. P. Colonization of the human oral cavity by strain of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 64, n. 11, p. 1272-1274, Nov. 1985.
42. IDA, H. et al. A DNA probe specific to *Streptococcus sobrinus*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 14, n.4, p. 233-237, Aug. 1999.
43. IGARASHI, T. et al. Identification of mutans streptococcal species by the PCR products of the dex genes. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 99-105, Aug. 2001.
44. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Polymerase chain reaction for identification of oral streptococci: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei* and *Streptococcus salivarius*. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v. 34, p. 81-88, 1998.
45. IGARASHI, T. et al. Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 32, n.6, p. 394-397, June 2001.

46. KAMIYA, U. R. **Análise genotípica e mutacinotipagem de Streptococcus mutans isolados de voluntários cárie-ativos e livres de cárie.** 2003. 133 f. Tese (Mestre em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.
47. KLEIN, M. I. **Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de Streptococcus mutans e Streptococcus sobrinus: estudo longitudinal em crianças.** 2003. 130 f. Tese (Mestre em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.
48. KLEIN, M. I. et al. Perfil de colonização da cavidade bucal de crianças por Streptococcus mutans e por Streptococcus sobrinus. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, suppl., p. 180, set. 2003.
49. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of Streptococcus mutans and some aspects of bacterial transmission. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 86 n. 1, p. 35-42, Jan. 1978.
50. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D.; KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium Streptococcus mutans in their infants. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 225-231, 1983.

51. 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.**, Copenhagen, v. 3, n. 1, p. 14-17, Mar. 1988.
52. KOZAI, K. et al. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 43, n.2, p. 99-106, 1999.
53. KREULEN, C. M. et al. Streptococcus mutans in children using nursing bottles. **J. Dent. Child.**, Fulton, v. 2 , p. 107-111, Mar./Apr. 1997.
54. LEAL, C. et al. Correlação entre contaminação de escovas dentais infantis e condições de saúde bucal – cultura microbiológica e MEV. **Rev. Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, suppl., p. 86, set. 2003.
55. LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 74, n. 2, p. 681-685, Feb. 1995.
56. LI, I.; CAUFIELD, P.W.; REDMO-EMANUELSSON, I.; THORNQVIST, E. Differentiation of Streptococcus mutans e Streptococcus sobrinus via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 16, n. 1, p. 16-23, Feb. 2001.

57. LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. **Caries Res.**, Basel, v. 25, n. 2, p. 146-152, 1991.
58. LIRA, C. C. et al. Experiência e distribuição da cárie dentária entre crianças de 2 a 5 anos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 55-66, 2001.
59. LUCAS, V. S.; BEIGHTON, D.; ROBERTS, G. J. Composition of the oral streptococcal flora in health children. **J. Dent.**, Guildford, v. 28, n. 1, p. 45-50, Jan. 2000.
60. MACARI, S. et al. Faca de dois gumes. **Rev. ABO Nac.**, São Paulo, v.9, n. 3, p. 185-187, jun./jul. 2001.
61. MARCHANT, S. et al. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.**, Basel, v. 35, n. 6, p. 397-406, Nov./Dec. 2001.
62. MATTOS-GRANER, R. O. et al. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com a frequência e severidade de cárie dental. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 4, p. 309-314, out./dez. 1998.

63. MATTOS-GRANER, R. O. et al. Genotypic diversity of *Mutans streptococci* in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2313-2316, June 2001.
64. MATTOS-GRANER, R. O. et al. *Mutans streptococci* oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. **J. Public Health Dent.**, Richmond, v. 61, n. 3, p. 161-167, Summer 2001.
65. NAPIMOGA, M. H. et al. Potencial cariogênico de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* isolados de voluntários livres de cárie e cárie-ativos. **Rev. Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, suppl., p. 47, set. 2001.
66. NASCIMENTO, M. M. **Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados da cavidade oral de indivíduos com lesões de cáries coronária e radicular.** 2002, 137f. Tese (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2002.
67. NASCIMENTO, M. M.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Polimorfismo genético de *S. mutans* isolados de cárie dental. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, suppl., p. 81, set. 2001.

68. NELSON FILHO, P. et al. 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. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 4, n. 1/2, p. 83-87, jan./jun. 1996.
69. NIE, F.; FAN, M.; BIAN, Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a Chinese population. **Caries Res.**, Basel, v. 36, n. 3, p. 161-166, May/June 2002.
70. OHO, T. et al. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 15, n. 4, p. 258-262, Aug. 2000.
71. OKADA, M. et al. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 51, n. 5, p. 443-447, May 2002.
72. PACKER, B. N.; VALENTE, P. H. M.; BRETZ, W. A. Avaliação de fatores relacionados à transmissão de infecções pelos estreptococos do grupo mutans. **Rev. ABO Nacional**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 108-113, abr./maio 1999.

73. PEREIRA, C. V. et al. Formación de placa bacteriana in vitro, polisacáridos extracelulares y producción de ácido por *Streptococcus mutans* de la cavidad oral. **Rev. Fola/Oral**, São Paulo, v. 6, n. 17, p. 34-40, jan./jun. 2000.
74. PIMENTA, F. C.; MARIN, J. M.; UZEDA, M.; ITO, I. Y. Prevalence of *mutans streptococci* 93 members from six Brazilian families. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 181-186, jul./set. 2001.
75. RAMOS-GOMEZ, F. J. et al. Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, Birmingham, v. 26, n. 2, p. 165-173, Winter 2002.
76. REDMO EMANUELSSON, I. M.; THORNQVIST, E. Distribution of *mutans streptococci* in families: a longitudinal study. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 59, n. 2, p. 93-98, Apr. 2001.
77. REDMO EMANUELSSON, I.; WANG, X. Demonstration of identical strains of *mutans streptococci* within Chinese families by genotyping. **Eur. J. Oral Sci**, Cambridge, v. 106, n. 3, p. 788-794, June 1998.
78. REDMO EMANUELSSON, I. M. et al. Tracing genotypes of *mutans streptococci* on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD)

- analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n. 1, p. 24-29, Feb. 2003.
79. ROSA, O. P. S.; SANCHES, F. A. C. Transmissibilidade de estreptococos mutans de mãe para filho e prevenção. **Rev. Dental Press Biol. Oral**, Bauru, v. 1, n. 1, p. 37-50, jan./fev./mar./abr. 2000.
80. SANTOS, A. P. P.; SOVIERO, V. M. Caries prevalence and risk factors among children aged 0 to 36 months. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 203-208, jul./set. 2002.
81. SATO, T. et al. Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 323-326, Oct. 2003.
82. SATO, T., et al. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 66-69, 2003.
83. SHKLAIR, I. L.; KEENE, H. J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 1079-1081, Nov. 1974.

84. SLAVKIN, H. C. First encounters: Transmission of infectious oral diseases from mother to child. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 128, n. 6, p. 773-778, June 1997.
85. SLAVKIN, H. C. Streptococcus mutans, early childhood caries and new opportunities. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 130, n. 12, p. 1787-1792, Dec. 1999.
86. SNEATH, P. H. A.; JOHNSON, R. The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological tests. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 72, n.2, p. 377-392, Sept. 1972.
87. SOARES, P.V. et al. Avaliação da contaminação de escovas dentais por microrganismos e efetividade de anti-sépticos na sua descontaminação. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 18, suppl., p.73, Sept. 2004.
88. de SOET, J. J. et al. Transmission of mutans streptococci between mothers and children with cleft and/or palate. **Cleft Palate Craniofac. J.**, Pittsburg, v. 35, n. 5, p.460-464, Sept. 1998.
89. SPOLIDORIO, D. M. P. **Biotipos de Streptococcus grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de**

diferentes classes sócio-econômicas. 1997. 131f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1997.

90. SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. **Brazilian J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n.3, p. 213-217, Jul./Sept. 2003.
91. SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Viability of *Streptococcus mutans* on transparent and opaque toothbrushes. **J. Dent. Hyg.**, Chicago, v.77, n.2, p.114-117, Spring 2003.
92. SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Salivary biotypes of *mutans Streptococci* levels in school children aging 6-8 year old having a socioeconomic base. **Braz. J. Oral Sci.**, Piracicaba, n.8, v.3, p.390-394, Jan./Mar. 2004.
93. STIPP, R. N.; FLÓRIO, F. M.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Frequência de isolamento e análise in vitro do potencial cariogênico de estreptococos grupo *mutans*. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, suppl., p. 96, set. 2002.

94. TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. **J. Dental Educ.**, Washington, v. 65, n. 10, p. 1028-1037, Oct. 2001.
95. THORILD, I.; LINDAU-JONSON, B.; TWETMAN, S. Prevalence of salivary streptococcus mutans in mothers and their preschool children. **Int. J. Paediat. Dent.**, Oxford, v. 12, n.1, p. 2-7, Jan. 2002.
96. THURNHEER, T. et al. Automated fluorescent in situ hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v. 44, n.1, p. 39-47, Feb. 2001.
97. TOI, C. S.; BONECKER, M.; CLEATON-JONES, P. E. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during atraumatic restorative treatment. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, n.3, p. 160-164, June 2003.
98. TOMITA, N. E. et al. Prevalência de cárie dentária em crianças da faixa etária de 0 a 6 anos matriculados em creches: importância de fatores socioeconômicos. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 413-420, Out. 1996.

99. TOMITA, N. E. et al. Prevalência de cárie dentária em crianças da faixa etária de 0 a 6 anos em creches de Bauru e São Paulo. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 2, n. 3, p. 26-33, jul./set. 1994.
100. van HOUTE, J.; GREEN, D. B. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. **Infect. Immun.**, Washington, v. 9, n. 4, p. 624-630, Apr. 1974.
101. van HOUTE, J.; YANNOVER, L.; BRECHER, S. Relationship of levels of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 381-386, 1981.
102. VAN PALENSTEIN-HELDERMAN, W. H.; IJSSELDIJK, M.; HUIS IN 'T VELD, J. H. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 599-603, 1983.
103. WAN, A. K., et al. Oral colonization of streptococcus mutans in six-month-old predentate infants. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 80, n. 12, p. 2060-2065, Dec. 2001.

104. WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 35, p. 13-26, Apr. 1964.

105. YANO, A. et al. Real time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 217, n. 1, p. 23-30, Nov. 2002.

GUIMARÃES, M. S. **Contaminação cruzada em escovas dentais por *Streptococcus mutans***. Araraquara, 2005, 149 p. Tese (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação de escovas dentais por *Streptococcus* grupo *mutans* e a ocorrência de infecção cruzada por *Streptococcus mutans* após armazenagem conjunta das mesmas. A amostra foi composta de 46 crianças de 6 a 7 anos de idade divididas em Grupo A com 22 e Grupo B com 24 alunos, de acordo com a sala de aula que freqüentavam. As amostras de biofilme obtidas da cavidade bucal das crianças no início do estudo e o biofilme das escovas dentais das crianças que compartilhavam o mesmo ambiente, foram recolhidas após 21 dias e cultivadas sob condições adequadas em meio de cultura SB₂₀. Em cada escova foram isoladas UFC com morfologia típica, as quais foram identificadas por meio de testes bioquímicos e o polimorfismo genético foi detectado pela técnica de AP-PCR. Pode-se observar 94 UFC de *Streptococcus mutans* isoladas a partir das escovas dentais. O crescimento bacteriano ocorreu em 14 escovas dentais, sendo que 6 escovas pertenciam às crianças do Grupo A, e 8 às crianças do Grupo B. Dos microrganismos encontrados nas escovas dentais, 83,92% eram *Streptococcus mutans*. Todos os isolados apresentaram perfil genético distinto, com exceção de 4 e 3 amostras dos Grupo A e B respectivamente, os quais pertenciam a mesma escova dental. Pode-se concluir

que dos microrganismos encontrados, ocorreu maior prevalência de colonização por *Streptococcus mutans* nas crianças e escovas analisadas, não havendo evidência de que a armazenagem conjunta de escovas dentais pode ser um veículo para infecção cruzada por este microrganismo.

Palavras-chave: Streptococcus mutans, contaminação, creches, escovas de dente.

GUIMARÃES, M. S. *Streptococcus mutans* cross-section infection in toothbrushes. Araraquara, 2005, 149 p. Tese (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the contamination of toothbrushes by mutans streptococci and cross-section infection of *Streptococcus mutans*. Forty-six children aged from 6 and 7 years were divided into two groups, Group A with 22 children and Group B with 24, according to attending class. A dental plaque sample from each participant was collected at the beginning of the study and the plaque present in toothbrushes was collected after 21 days. The samples were processed and cultivated under adequate conditions in SB20 medium. Typical morphotype mutans streptococci colonies were isolated and submitted to biochemical tests for identification. An arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) method was performed for genotypic characterization of *Streptococcus mutans*. Fourteen toothbrushes were contaminated by mutans streptococci, 6 in Group A and 8 in Group B. *Streptococcus mutans* represented 83,92% of the mutans streptococci identified. The presence of matching genotypes of *Streptococcus mutans* has occurred in 4 strains of Group A and in 3 strains of Group B. However, for both groups, the matching genotypes belonged to the same toothbrush. In conclusion, *Streptococcus mutans* was the predominant

specie in both dental plaque and toothbrush. The latter did not represent a source of cross-sectional infection of such microorganism.

Key-words: *Streptococcus mutans*, contamination, nursery school, toothbrushes

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos.

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu,....., portador do RG n°:....., comanos de idade e endereço....., responsável pelo menor....., com anos de idade, RG n°....., após ter recebido as informações sobre a pesquisa intitulada “Polimorfismo genético de *Streptococcus mutans* isolados de escovas dentais de crianças cárie ativas” a ser realizada pelo CD Murilo de Sousa Guimarães, pós-graduando da Disciplina Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, visando conhecer a transmissão de bactérias entre as crianças no ambiente escolar através de escovas de dentes e a melhor forma de acondicionamento das mesmas, consinto na remoção de material depositado sobre a superfície do dente (biofilme), com auxílio de cotonete, bem como a respectiva devolução da escova dental que fora previamente doada pelo Cirurgião-Dentista, a fim de posterior utilização em pesquisa científica e ensino, preservando a identidade do menor. Estou ciente que será mantida a forma como as escovas atualmente vêm sendo acondicionadas na Instituição.

Estou ciente também, que posso deixar de colaborar com a pesquisa a qualquer momento e receberei qualquer esclarecimento sobre a mesma.

Araraquara, de de 2004.

Assinatura do responsável

Pesquisador responsável: Murilo de Sousa Guimarães - CRO: 80059 F.: 233-3360

Assinatura/carimbo:.....

Comitê de Ética: 201-6432/6434




Protocolo CEP Nº 27/03

Aprovado em Reunião de

19/03/04

Secretária do CEP-FO/CAr.

**Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de
Odontologia de Araraquara – UNESP.**

<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p style="text-align: center;">Comitê de Ética em Pesquisa</p> <h2 style="text-align: center;">Certificado</h2> <p>Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "POLIMORFISMO GENÉTICO DE STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLADOS DE ESCOVAS DENTAIS DE CRIANÇAS CÁRIE ATIVAS", sob o protocolo nº 28/03, de responsabilidade do Pesquisador (a) MURILLO DE SOUSA GUIMARÃES, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (Um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.</p>	<p>Certify that the research project titled "GENETIC POLIMORFISM OF STREPTOCOCCUS MUTANS ISOLATED IN TOOTHBRUSHES OF CHILDREN", protocol number 28/03, under Dr MURILLO SOUSA GUIMARÃES responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur.</p> <p style="text-align: right;">Araraquara, 19 de março de 2004.</p> <p style="text-align: right;">  Prof.ª Miriam Aparecida Onofre Coordenadora </p>
---	---

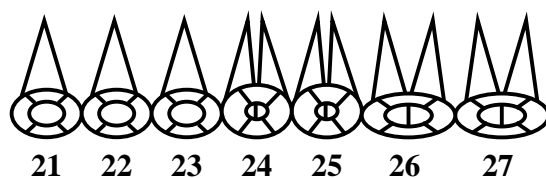
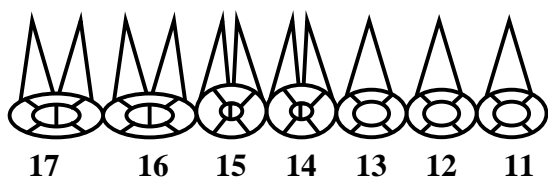
ANEXO 3

Ficha para identificação e exame clínico.

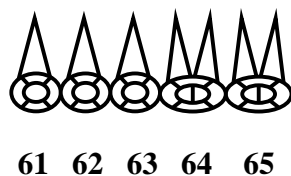
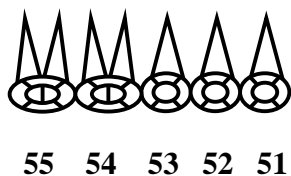
Nome: _____

Idade: _____

Sala: _____

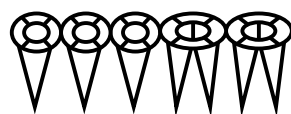
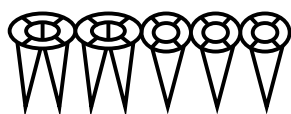


Vestibular



85 84 83 82 81

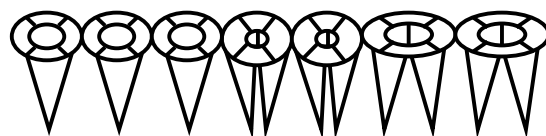
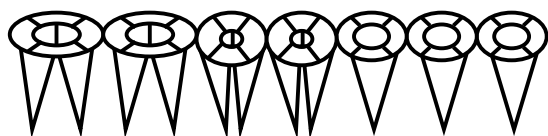
71 72 73 74 75



Vestibular

47 46 45 44 43 42 41

31 32 33 34 35 36 37



ANEXO 4**MEIO DE CULTURA SB₂₀**

Bacto-casitone (Difco)	15,0g
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
L – Cistina (Merck)	0,2 g
Sulfito de Sódio (Merck)	0,1 g
Acetato de Sódio (Merck)	20,0 g
Sacarose	200,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 mL

Os componentes devem ser dissolvidos em água destilada e autoclavados a 120°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento a aproximadamente 50°C, deve-se adicionar 5,0 mL de uma solução de bacitracina a 20,0 µg/mL.

ANEXO 5

MANUAL DE BERGEY (1986)

Bactérias	<i>S. mutans</i> <i>S. rattus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. ferus</i> <i>S. downei</i> <i>S. macacae</i>							
	(I)	(V)	(II)	(III)	(IV)			
Provas	c, f	e	b	a	d, g	c	h	c
Fermentação de:								
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+
Melibiose	+	-	+	+	-**	-	-	-
Rafinose	+	+	+	+	-	-	-	+
Hidrólise de Arginina	-	-	+	-	-	-	-	-
Bacitracina	+	+	+	-	+	-	-	-
Produção de H₂O₂	-	-	-	-	+	-	-	-

(*) Algumas cepas podem dar resultado negativo.

(**) Algumas cepas podem dar resultado positivo.

ANEXO 6**MEIO PARA PROVA DE HIDRÓLISE DE ARGININA**

Extrato de levedura	0,5 g
Triptona	0,5 g
Fosfato dipotássico	0,2 g
Glicose	0,05 g
D-arginina	0,3 g
Água destilada q.s.p	100,0 mL

Os componentes devem ser dissolvidos em água destilada, distribuídos em tubos de ensaio em quantidade de aproximadamente de 2,0 mL e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

ANEXO 7**REATIVO DE NESSLER**

Solução A – Iodeto de potássio	5,0 g
Água destilada q.s.p.	5,0 mL
Solução B – Mercúrio clorídrico	2,5 g
Água destilada q.s.p.	10,0 mL
Solução C – Hidróxido de potássio	15,0 g
Água destilada q.s.p.	30,0 mL

Dissolve-se 5,0 g de iodeto de potássio em 5,0 mL de água destilada (solução A). Em seguida adiciona-se pouco a pouco a solução de mercúrio clorídrico (solução B), dissolvida em banho-maria e adicionada ainda quente, a fim de se evitar a precipitação ou dissolução não homogênea. A adição deve ser controlada para que o precipitado formado no início não fique completamente dissolvido. Após resfriamento, adiciona-se a solução de hidróxido de potássio (solução C) e água destilada até completar o volume total de 100,0 mL. Logo após, adiciona-se 0,5 mL da solução restante de mercúrio clorídrico. Após decantação, o sobrenadante deve ser acondicionado em frasco âmbar, fechado e conservado em ambiente fresco.

ANEXO 8**MEIO PARA PROVA DE
PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Extrato de carne	0,5 g
Extrato de levedura	0,5 g
Tween 80	0,05 mL
Sulfito de manganês	0,01 g
Agar	1,5 g
Água destilada q.s.p	90,0 mL

ANEXO 9**TAMPÃO TE**

Tris	0,12 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,04 mL
Água destilada ultra-pura q.s.p.	80,0 mL

Dissolver os componentes em água destilada ultra-pura e acertar o pH com HCl 1N, em 8,0. Autoclavar a 120°C durante 20 minutos.

ANEXO 10**GEL DE AGAROSE 1,4%**

Agarose ultra-pura.....	1,4 g
TEB diluído (ANEXO 11).....	100 mL

Dissolver a agarose ultra-pura no TEB diluído em água destilada ultra pura (1/10). Pesar, ferver em microondas e acrescentar água destilada ultra-pura até se atingir o peso inicial.

ANEXO 11**TAMPÃO TRIS-BORATO-EDTA (TEB)**

Ácido bórico.....	55,0 g
Tris.....	108,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0.....	40,0 mL
Água destilada ultra-pura q.s.p.	até completar 1000 mL

Dissolver o Ácido bórico e o Tris em 40 mL de solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0), e acrescentar volume de água destilada ultra-pura até se completar 1000 mL. Utilizar esta solução diluída (1/10) em água destilada ultra-pura, para a corrida e gel de agarose.