MARTA ESTELA SARAVIA

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA PARA CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA DE *S. MUTANS* E *S. SOBRINUS*, UTILIZANDO O MEIO DE CULTURA SB-20 MODIFICADO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

Saravia, Marta Estela

Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2010.

93p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Silva, Lea Assed Bezerra da

1. Estreptococos do grupo mutans 2. *Streptococcus mutans*. 3. *Streptococcus sobrinus*. 4. SB-20. 5. SB-20M. 6. MSB. 7.CaSaB-20M 8. Identificação morfológica. 9. Identificação bioquímica

Folha de Aprovação

Saravia ME. **Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo*.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura: _____

MARTA ESTELA SARAVIA

DADOS CURRICULARES

NASCIMENTO 17 de maio de 1960, Añatuya, Santiago del Estero, Argentina

FILIAÇÃO Gerardo Noé Saravia e Estela Mirella Corvalan de Saravia

1983-1987 Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán - Argentina

1985-1987 Auxiliar de docência na Cátedra de Microbiologia e Parasitologia - Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán - Argentina

1988-2009 Professora da disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán - Argentina

2000-2006 Curso de Pós-Graduação com obtenção do título de Docente Autorizado da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán - Argentina

2007-2010: Doutorado em Ciências
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
Tese: "Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo*."
Orientador: Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva
Bolsa: CAPES

Trabalho desenvolvido no *Laboratório de Histologia e Microscopia* do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP e no *Laboratório de Microbiologia* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva, com apoio financeiro da CAPES (bolsa) e participação do Prof. Dr. Claes-Göran Emilson, do Departamento de Cariologia - Instituto de Odontologia - The Sahlgrenska Academy at Gothenburg University - Gothenburg - Sweden.

DEDICO ESTE TRABALHO,

Aos meus pais *Estela Mirella Corvalan de Saravia* e *Gerardo Noé Saravia* *(in memoriam)*. Obrigada pela dedicação, carinho e esforço. Por terem me dado uma infância mais que feliz e me oferecido sempre o melhor. Por terem me ensinado que é necessário lutar e trabalhar muito, sem deixar de sonhar, para alcançarmos tudo o que queremos. Amo vocês!

À minha irmã *Veronica* e ao meu irmão *Gerardo*, pelo incentivo e por vibrarem comigo a cada conquista. À minha cunhada *Elvia* e minhas sobrinhas *Mariana* e *Antonella*, pelo amor e pelo apoio.

A meus sogros *Elena* e *Miguel* (*in memorian*), pelo apoio e carinho constante no decorrer de meu trabalho. Obrigada sempre!

Ao **meu marido** *Daniel*, pelo carinho, generosidade e companheirismo. Algumas pessoas são especiais. Você é uma destas pessoas! Obrigada por acreditar em mim, pelo apoio constante, pela paciência e pelo equilíbrio, apesar das adversidades que algumas vezes estiveram presentes. Te admiro muito, inclusive porque me incentivou a optar pelo Doutorado em outro país, mesmo sabendo que poderia ser em detrimento da tranqüilidade de nossa vida comum. À **minha adorada filha** *Catalina*, cheia de coisas boas. Seu sorriso e sua ternura são características marcantes, que sempre a acompanham.
Obrigado por serem as pessoas que trazem paz à minha vida e me dão a força que muitas vezes me falta! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À *Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*. Com todo o meu carinho, *minha Professora, conselheira, amiga e irmã,* minha eterna gratidão pelo apoio em todos os momentos. Sem a senhora eu não teria chegado até aqui. Tenho muitas coisas para aprender na vida e, dentre essas, ser uma pessoa verdadeira e especial como a senhora. Agradeço pela orientação segura durante toda a minha pós-graduação e de tantos outros. Por me mostrar um mundo diferente. Pelo direcionamento científico e acadêmico: ninguém nunca me falou coisas tão certas! A senhora tem dons especiais, incluindo firmeza, eficiência e habilidade para aconselhar de forma acertada, por mais que o conselho seja duro para quem o escuta. As pessoas que compartilham e passam por sua vida conhecem a generosidade do seu coração. Admiro-a por todas as suas conquistas científicas e acadêmicas, por sua personalidade e por sua trajetória. Obrigada por ser como é e por acreditar na minha capacidade. Agradeço ainda por permitir o desenvolvimento deste trabalho, por ter me recebido como aluna, pelo apoio nos momentos em que eu estava longe de minha família, por guiar meus passos e pelo carinho dedicado à minha filha.

À *Profa. Dra. Izabel Yoko Ito*, por ter me recebido em seu laboratório como uma filha. Agradeço por acreditar que eu seria capaz de aprender os segredos do laboratório de Microbiologia e realizá-los! E contar uma estória com esse aprendizado... Por me ensinar que a persistência, a humildade e o silêncio são características de um pesquisador nato. Por ser tão gentil e atenciosa. Por ter me permitido fazer parte da sua amizade.

A o *Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho*

Você é uma das pessoas especiais que conheci em minha vida. Aprendi, com sua garra e determinação, que precisamos viver plenamente nossa vida de pesquisador. Tenha a certeza de que você me incentivou a chegar até aqui, e me instruiu a fazer as coisas certas sempre. Admiro a forma com que conduz sua vida acadêmica e científica e tudo o que faz por seu Departamento, por sua disciplina e por seus alunos. Saiba que você é um exemplo que sigo no meu projeto de vida como ser humano e como pesquisadora. Quando estou distante em minha Faculdade na Argentina, sinto muita falta dos seus conselhos, ensinamentos e convivência, meu amigo.

Profs. Lea, Izabel e Paulo Nelson: vocês têm um lugar especial em meu coração, para sempre!

AGRADECIMENTOS

À família **Assed Bezerra da Silva,** representada **pelo Ernani, Léa, Ricardo e Raquel,** pela acolhida constante, pela companhia aos Domingos e por tornar minha vida mais fácil longe do meu marido e da minha filha. Vocês não imaginam o quanto a convivência com vocês diminuiu minha saudade dos meus familiares e amigos do meu país. Obrigada por tudo! Serei eternamente grata a vocês.

À **Profa. Dra.** ***Gisele Faria,*** por sua amizade, disponibilidade e generosidade, me permitindo compartilhar de sua casa. Espero que algum dia eu possa retribuir toda a ajuda que recebi.

Ao ***Prof. Dr. Claes Göran Emilson,*** por ter abraçado minha causa como se fosse sua e ter me concedido a oportunidade da troca de experiências científicas e pessoais extremamente ricas. Obrigada por tudo!

Às famílias ***Bravo Romero***, representada pelo ***Domingo*** e ***Marta Inês*** e ***Rizzo Bravo***, representada pela ***Claudia*** e ***Carlos***, pela amizade de toda uma vida de carinho, compreensão e disponibilidade, em especial à atenção que deram a meu marido e à minha filha durante todo o tempo em que eu estive ausente da Argentina.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor ***Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon*** e do Vice-Diretor ***Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros*** e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da ***Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva***.

À Faculdade de Odontología de Tucumán da Universidade Nacional de Tucumán, na pessoa do atual Diretora ***Profa. Dra. María Isabel Ferrari de Hernández*** , do Vice-Diretor ***Prof. Dr. Daniel A. García,*** do Secretario Acadêmico ***Prof. Jorge Olmos Fassi*** e do Secretario da Pós-Graduação ***Prof. Horacio Correa.***

Ao ***Prof. Dr. Marcos A. Rossi***, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, que me recebeu com generosidade e me permitiu o uso do seu laboratório, me ensinando a técnica de microscopia eletrônica de varredura para colônias de bactérias. Suas importantes contribuições científicas serão de muito valor na minha formação em pesquisa. Obrigada pela disponibilidade, pela amizade e, principalmente, pelas conversas científicas e sobre experiências de vida.

Às Professoras da Disciplina de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán, Argentina, *Profa. Rosa Elisa Ruiz de Valladarez e Prof. Dra. Laura Ida Benito de Cárdenas*. Com o apoio de vocês consegui alcançar este sonho. Obrigada!

Ao *Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo*, pelas importantes contribuições e por nossas conversas científicas e troca de experiências de vida. Pela atenção e disponibilidade, pela amizade e por sempre me receber com muito carinho.

À *Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto*, pelo acolhimento, confiança e incentivo. Muito obrigada pela atenção no início desta caminhada.

À Profa Dra. *Raquel Assed Bezerra da Silva.* Obrigada por sua amizade e por ser a pessoa prestativa da qual tive sempre uma palavra de tranqüilidade frente aos meus desesperos, como foi o dia da qualificação e da proficiência em Português. Lembrarei para sempre da sua presença nesses momentos e em muitos outros. A você meu carinho e agradecimento.

À *Profa. Dra. Sada Assed* e *Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz*, que sempre me acolheram com muito carinho. Pelo apoio oferecido e pelas contribuições valiosas durante o exame de qualificação.

À *Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano*, *Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas e Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva*, pelo apoio oferecido, pelos ensinamenteos e pelas conversas agradáveis.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Profa. Dra. Sada Assed, Profa. Dra. Aldevina Campos Freitas, Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira* e *Prof. Dr. Adilson Thomazinho*, e a todos os professores da Pós-Graduação, pela agradável convivência durante a minha formação acadêmica e científica.

Às Professoras da Disciplina de Endodontia, Química Biologica e Anatomía Patólogica da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán, Argentina, *Profa. Dra. María Elena Lopéz, Profa. Carmen Vargas Cuneo, Profa. Mercedes Salas, Profa. Míriam*

Koss, Profa. Judith Jalman, Profa. Judit Schalmach, Prof. Dra. Diana Atlas, Profa. Dra. María de los Angeles Bulacio, Profa. Dra Lília Leonardi, Profa. Dra. María Luisa de la Casa, Profa. Viviana Cuezz e *Profa. Dra. Silvia Carino*. Obrigada! Vocês sempre estiveram ao meu lado, incentivando-me.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Nacional de Tucumán, Argentina, *Prof. Diego Silvera Estévez, Profa. Norma Hillen, Prof. Martín Zalduend* e *Profa. Silvina Tíneo*, aos pós-graduandos *María Paula Nazar , María Gabriela Montero* e aos graduandos **María del** *Milagro Salas* e *Marcos Gramaglia*, pela disponibilidade, pela atenção, pelas conversas, pelos ensinamentos, pelos questionamentos e pela cooperação. Fico muito feliz por trabalhar com vocês no Projeto de Cariologia. Obrigada a todos.

Aos Professores *Daniel García* da Universidade Nacional de Tucumán, Argentina, e *Gustavo Moncada* e *Ivan Urzua*, da Universidade do Chile, pela confiança apoio e companherismo, sobretudo pela contribuição que me deram sempre, acrescentando conhecimentos e, em especial, pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Aos *Pós-Graduandos da Odontopediatria (Mestrado e Doutorado)* das turmas 2007-2009, pela troca de experiências e pela convivência agradável. Foi um privilégio compartilhar meu tempo com vocês.

Ao *Marco Antônio dos Santos*, por toda a ajuda e disponibilidade desde o primeiro dia, quando cheguei no Departamento. Serei eternamente grata a você.

Aos demais funcionários e ex-funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Fátima Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Filomena Lelli Placcití, Nilza Letícia Magalhães, Nilva Aparecida Afonso Ruggiero, Rejane Gomes Cavalheiro Mazzer* e *Dr. Francisco Wanderley de Paula e Silva*, e aos funcionários do "Centro de Formação de Recursos Humanos no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais", *Dra. Gisele Faría, Carolina Paes Torres Mantovaní, Fátima Rizóli* e *Renata Aparecida Fernandes Rodrigues*, pela amizade e atenção que sempre prestaram a mim.

À minha amiga e *Professora* *Ana Tereza Mirelle de Castro,* por sua dedicação e carinho em me ensinar o idioma Português.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Isabel Cristina Galino Sola* e *Regiane Cristina Moi Sacílotto*, pela cordialidade e atenção.

À *Maraísa Palhão Verrí* e *Vania Cláudia de Albuquerque*, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, pelo apoio incondicional. Vocês têm sido grandes amigas de coração e foram verdadeiros planos de sustentação no laboratório e em todos os momentos difíceis. Obrigada pelo carinho e pela compreensão.

Às crianças da *Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP* e da *Creche Lar Santana* - Ribeirão Preto - SP.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)*, pelo suporte financeiro, fundamental para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

Muito obrigada a cada um de vocês.

RESUMO

Saravia ME. **Quantificação e identificação morfológica e bioquímica para confirmação fenotípica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, utilizando o meio de cultura SB-20 modificado: Estudos *in vitro* e *in vivo*** [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

Tendo em vista o importante papel desempenhado pelos *Streptococcus mutans* e pelos *Streptococcus sobrinus* na etiologia da cárie dental, assim como a relevância do meio de cultura empregado para a detecção desses microrganismos, os objetivos do presente estudo foram: Capítulo 1- Avaliar a eficácia do meio de cultura SB-20 modificado (SB-20M) na diferenciação morfológica de colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, comparativamente à análise bioquímica das colônias isoladas, na saliva de crianças; Capítulo 2- Comparar os meios de cultura SB-20, SB-20M e MSB na quantificação (contagem) de unidades formadoras de colônias (ufc) e na diferenciação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e *S. sobrinus*, na saliva de crianças; e Capítulo 3- Empregar o meio de cultura SB-20M sem ágar, denominado Caldo Sacarose-Bacitracina modificado (CaSaB-20M), para avaliar a viabilidade de cepas padrão de *S. mutans* (ATCC25175) *in vitro* e a viabilidade de estreptococos do grupo mutans *in vivo*, nas cerdas de escovas dentais, após diferentes períodos de secagem. No Capítulo 1, a eficácia do meio SB-20M foi avaliada tomando-se amostras de saliva não-estimulada de 145 crianças de 6 a 12 anos de idade, por meio da técnica da espátula de madeira. Após semeadura e incubação em microaerofilia, foi efetuada a contagem das ufc em microscópio estereoscópico e realizada a identificação morfológica e bioquímica (biotipagem) das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus*. Os resultados obtidos após as identificações morfológicas e bioquímicas foram comparados empregando o teste x^2. No Capítulo 2, a comparação dos meios de cultura SB-20, SB-20M e MSB foi efetuada em amostras de saliva não-estimulada, colhidas de 20 crianças na faixa etária de 4 a 12 anos, em tubos de ensaio. Amostras de saliva pura e diluídas até 10^{-4} foram semeadas em placas contendo os referidos meios, por meio de um micrométodo, e incubadas em microaerofilia. A seguir, foi efetuada a contagem das ufc e a identificação morfológica e bioquímica das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus*. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste de Wilcoxon e o teste exato de Fisher. No estudo *in vitro* do Capítulo 3, um total de 45 escovas dentais infantis, divididas em 9 grupos (n=5 por grupo), foram contaminadas com uma suspensão contendo *Streptococcus mutans* (cepa ATCC 25175), na concentração de 1.720.000 unidades formadoras de colônias por mL (escala 0,5 de McFarland), durante 4 minutos. Logo após a lavagem, as escovas do Grupo 1 (controle) foram submetidas ao processamento microbiológico. As escovas dos Grupos 2 a 9 foram mantidas à temperatura ambiente por 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, respectivamente, previamente ao processamento microbiológico, em meio de cultura CaSaB-20M. A seguir, foi efetuada a contagem

de ufc de *S. mutans* nas cerdas. Os resultados obtidos foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis. No estudo *in vivo* do Capítulo 3 participaram 20 crianças de 4 a 8 anos com alto risco à cárie dental. Cada criança recebeu 13 escovações, com intervalo de 3 dias entre cada escovação, empregando sempre uma escova dental nova, sem dentifrício. As 260 escovas obtidas foram divididas em 13 grupos (n=20 por grupo). Logo após a lavagem, as escovas do Grupo 1 (controle) foram submetidas ao processamento microbiológico. As escovas dos Grupos 2 a 13 foram mantidas à temperatura ambiente por 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas, respectivamente, previamente ao processamento microbiológico, ou seja, semeadura e incubação em meio CasB-20M. Após a incubação foi efetuada a contagem de ufc de *S. mutans* e a quantificação dos polissacarídeos extracelulares presentes nas cerdas. Os dados obtidos foram avaliados por meio do teste de Wilcoxon. O nível de significância em todas as análises estatísticas foi de 5%. Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que o método de identificação morfológica, empregando o meio de cultura SB-20M, foi confiável para a identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os meios SB-20 e SB-20M foram semelhantes na quantificação de estreptococos do grupo mutans e na identificação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, evidenciando que a substituição da sacarose pelo açúcar cristal não alterou a eficácia do meio. Quando comparado ao meio MSB, o SB-20M apresentou resultados estatisticamente superiores, com relação à quantificação de ufc e com relação à identificação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*. O Caldo Sacarose-Bacitracina modificado (CaSaB-20M) permitiu avaliar a viabilidade de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais, após diferentes períodos de secagem. De acordo com o estudo *in vitro* com cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), observou-se viabilidade de microrganismos nas escovas dentais por até 8 horas. Por outro lado, no estudo *in vivo*, os estreptococos do grupo mutans permaneceram viáveis por períodos superiores (44 horas).

Palavras-Chave: Estreptococos do grupo mutans; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*; SB-20; SB-20M; MSB; CaSaB-20M; Identificação morfológica; Identificação bioquímica.

ABSTRACT

Saravia ME. **Morphological and biochemical quantification and identification for phenotypic confirmation of *S. mutans* and *S. sobrinus* by modified SB-20 culture medium: *in vitro* and *in vivo* studies** [Thesis]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2010.

The important role developed by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental caries ethyology as well as the relevance of the culture medium used for the detection of these microorganisms, the aims of the present study were divided into three parts as follows: Chapter 1 – To evaluate the modified SB-20 culture medium efficacy (SB-20M) in the morphologic differentiation of the *S. mutans* and *S. sobrinus* colonies comparatively to the biochemical analysis of the isolated colonies in children's saliva samples; Chapter 2 – To compare the culture media SB-20, SB-20M, and MSB in the quantification (counting) of the colony forming units (cfu), and in the morphological and biochemical differentiation of *S. mutans* and *S. sobrinus* in children's saliva; and Chapter 3 – To employ the SB-20M culture medium without agar, called Sucrose Bacitracin Broth Modified (CaSaB-20M), in order to evaluate the viability of the *in vitro S. mutans* pattern strains (ATCC 25175), and the viability of the *in vivo* mutans streptococci in toothbrush bristles after different dry periods. In Chapter 1, the efficacy of the SB-20M was evaluated by wood spatula technique using non-stimulated saliva samples of 145 children of 6 to 12 years old. After seeding and incubation in microaerophilic conditions, the cfu counting in stereoscopic microscope, and the morphological and biochemical identification (biotyping) of *S. mutans* and *S. sobrinus* colonies were made. The results obtained after morphological and biochemical identifications were compared by the X^2 test. In Chapter 2, the comparison of the SB-20, SB-20M, and MSB culture medium was made using assay tubes with non-stimulated saliva samples of 20 children with age between 4 and 12 years old. Samples of pure and diluted saliva (until 10^{-4}) were seeded by a micromethod in Petri dishes with the culture media, and incubated under microaerophilic conditions, followed by the cfu counting, and morphological and biochemical identification of *S. mutans* and *S. sobrinus* colonies. The results obtained were submitted to the statistical analysis using Wilcoxon test and the exact Fisher test. In the *in vitro* study of the Chapter 3, a total of 45 children's toothbrush divided in 9 groups (n=5 per group) were infected with a *Streptococcus mutans* (strain ATCC25175) suspension, under the concentration of 1.720.000 colony forming unities by mL (McFarland 0.5 scale) during 4 minutes. Briefly, after washing the Group 1 toothbrushes (control) were submitted to the microbiological processing. Group 2 to 9 toothbrushes were maintained in room temperature for 4, 8, 12, 14, 24, 36, 48, 60, and 72 hours respectively, previously to microbiological processing in CaSaB-20M culture medium. After that, the *S.* mutans cfu counting in the bristles were made. The results obtained were analysed by Kruskal-

Wallis test. In the *in vivo* study of the Chapter 3, 20 high caries risk children of 4 to 8 years old children have been participated. Each child received 13 times brushing, with intervals of 3 days between each brushing using always a new toothbrush with no toothpaste. The 260 obtained toothbrushes were divided into 13 groups (n=20 per group). After whashing the Group 1 toothbrushes (control) were submitted to microbiological processing. The other ones (groups 2 to 13) were maintained in room temperature for 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, and 48 hours respectively, previously the microbiological processing (CaSaB-20M). After incubation the *S. mutans* cfu counting and the quantification of extracellular polysaccharides present in the bristles were made. The data obtained were evaluated by Wilcoxon test. The level of significance in all statistical analysis was 5%. Based on the results obtained we could conclude that de morphological method for identification using SB-20M culture medium was trustable for the identification of *S. mutans* and *S. sobrinus*. The SB-20 and SB-20M showed the same effect in the quantification of the mutans streptococci, and in the morphological and biochemical identification of *S. mutans* and *S. sobrinus* evidentiating that the substitution of sucrose for coarse granular cane sugar (SB-20M) did not altered the efficacy of the medium. When compared to MSB medium, the SB-20M showed results statistically superiors with relation to cfu quantification, and morphological and biochemical of *S. mutans* and *S. sobrinus*. Sucrose-Bacitracin modified broth (CaSaB-20M) allowed the evaluation of the viability of mutans streptococci in toothbrush bristles after different drying times. According to the *in vitro* study with *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), we could observe viability of microorganisms in toothbrush bristles for 8 hours remaining. On the other hand, in the *in vivo* study the mutans streptococci remain viable for extended periods (44 hours).

Key-Words: Mutans streptococci; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*; SB-20; SB-20M; MSB; CaSaB-20M; Morphological identification; Biochemical identification.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 CAPÍTULO 1 27

Diferenciação morfológica e bioquímica entre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, no meio de cultura SB-20 Modificado (SB-20M).

3 CAPÍTULO 2 43

Comparação entre os meios de cultura SB-20, SB-20M e MSB na quantificação (contagem) de unidades formadoras de colônias e na diferenciação morfológica e bioquímica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

4 CAPÍTULO 3 61

Avaliação da viabilidade de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais, empregando o meio de cultura CaSaB-20M (Caldo Sacarose Bacitracina Modificado) - Estudo *in vitro* e *in vivo.*

5 CONCLUSÕES 81

REFERÊNCIAS 83

APÊNDICE 93

INTRODUÇÃO

Desde 1924, quando Clarke identificou os *Streptococcus mutans*, estes microrganismos têm sido sido intensamente estudados (Marsh, 2009; Rodis et al., 2009; Seow et al., 2009; Horiuchi et al., 2009; Simark-Mattsson et al., 2009; Doméjean et al., 2010), em função de serem considerados os agentes etiológicos primários da cárie dental (Ajdic et al., 2002; Berkowitz, 2003; McNeill e Hamilton, 2003; Guo et al., 2006).

Em 2002, o genoma dos *S. mutans* foi seqüenciado (Ajdic et al., 2002), exatamente 49 anos após a publicação da descoberta da estrutura da molécula do DNA pelos físicos Francis Harry Compton Crick e James Dewey Watson, na renomada revista *Nature* (Silveira, 2003). O conhecimento mais aprofundado da complexidade e especificidade genética desses microrganismos pode possibilitar que, em um futuro próximo, sejam desenvolvidos novos agentes antimicrobianos, com abordagens inovadoras, visando a prevenção e o tratamento da cárie dental.

Do ponto de vista microbiológico, a cárie dental é provocada por bactérias com alta similaridade fenotípica, classificadas como estreptococos do grupo mutans (Hamada e Slade, 1980; Lindquist e Emilson, 1991). A implicação desses microrganismos na etiologia da cárie dental, em humanos e animais experimentais, é inquestionável (Loesche, 1986; Takahashi e Nyvad, 2008).

Os estreptococos do grupo mutans são microrganismos cariogênicos encontrados no biofilme dentário e na saliva, que exibem padrões bioquímicos distintos e produzem polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose (Coykendall, 1974), representados por diferentes espécies e tipos sorológicos (sorotipos) de a-h (Hamada e Slade, 1980; Whiley et al., 1988; Whiley e Beighton, 1998; Nakano et al., 2004).

Cepas de *Streptococcus mutans* possuem os antígenos c, e ou f, porém o sorotipo c é responsável por 70-100% dos isolados de humanos. Outros isolados de humanos possuem os carboidratos com capacidade antigênica d e g, como os *Streptococcus sobrinus*. Os *Streptococcus rattus* (sorotipo b) e os *Streptococcus cricetus* (sorotipo a) (Hamada e Slade, 1980) recentemente sofreram alteração em sua denominação, passando a ser chamados de *S. criceti* e *S. ratti* (Truper e De Clari, 1997).

Um sorotipo c foi isolado de ratos selvagens e, por não estar relacionado geneticamente com os *S. mutans* foi denominado de *Streptococcus ferus* (Whatmore e Whiley, 2002). Adicionalmente, algumas cepas sorotipo c de macacos mostraram ser diferentes dos *S. mutans* e foram denominadas como uma nova espécie: *Streptococcus macacae* (Beighton et al., 1984). Em 1988, Whiley et al. descreveram o sorotipo h como *Streptococcus downei*.

Assim, quando os estreptococos do grupo mutans são classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas e genéticas, várias espécies de microrganismos podem ser reconhecidas (Hamada e Slade, 1980; Loesche, 1986), incluindo *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. ferus*, *S. macacae* e *S. downei*. Dentre essas espécies, as duas mais comumente isoladas da espécie humana (Hamada e Slade, 1980; Hofling et al., 1999) e mais diretamente envolvidas no processo da cárie dental são os *S. mutans* e os *S. sobrinus* (Hamada e Slade, 1980; Loesche, 1986; Fejerskov e Kidd, 2005; Saito et al., 2009).

Os níveis salivares de *S. mutans* e de *S. sobrinus* estão fortemente correlacionados com a prevalência de lesões de cárie (Duchin e Van Houte, 1978; Seppa et al., 1988; Weinberger e Wright, 1989), com a predição de novas lesões (Fujiwara et al., 1991) e com a determinação da atividade de cárie (Klock e Krasse, 1979; Köhler et al., 1981). Sua detecção no biofilme dentário e na saliva pode predizer o risco e servir para o monitoramento da atividade de cárie (Fontana e Zero, 2006).

Em humanos, os *S. mutans* são mais frequentemente isolados que os *S. sobrinus* (Loesche, 1986; Rodis et al., 2009; Doméjean et al., 2010). Estudos efetuados em várias regiões do mundo evidenciaram que mais de 98% dos indivíduos adultos apresentam *S. mutans* em sua cavidade bucal, enquanto o *S. sobrinus* está presente em apenas 7-35% (Gold et al., 1973; Wade et al., 1983; Van Palestein Helderman et al., 1983; Okada et al., 2002).

No entanto, os *S. sobrinus* são microrganismos altamente agressivos, mais sacarose-dependentes que os *S. mutans* (Gibbons et al., 1986) e que apresentam maior capacidade de produção de ácidos (De Soet et al., 1989; De Soet et al., 1990; Saito et al., 2009), dominando o biofilme dentário em indivíduos que fazem uso irrestrito de sacarose. Esses microrganismos sintetizam polissacarídeos intra e extracelulares e são capazes de sobreviver em ambientes extremamente ácido, à semelhança dos *S. mutans* (De Soet et

al., 1989). Por esse motivo, indivíduos que apresentam altas contagens de *S. sobrinus* na saliva ou no biofilme dentário apresentam maior risco de cárie que indivíduos que apresentam apenas a espécie *S. mutans* (Köhler et al., 1988; Fujiwara et al., 1991; Hofling et al., 1999; Lindquist e Emilson, 2004).

Além disso, a coexistência de *S. mutans* e *S. sobrinus* parece ser um importante fator no desenvolvimento da cárie dental (Lindquist e Emilson, 1991), uma vez que quando ambas as espécies estão presentes na cavidade bucal, ou seja, quando o indivíduo é multicolonizado, evidencia-se maior experiência de cárie nos indivíduos que quando se detecta apenas *S. mutans* (Köhler e Bjarnason, 1987; Seki et al., 2006). Segundo Rupf et al. (2006), a colonização por *S. sobrinus* representa um importante fator de risco adicional para a cárie dental.

A transmissão da microbiota cariogênica ocorre por meio de contatos diretos, via saliva (Tedjosasongko e Kozai, 2002), ou por meio de contatos indiretos (Newbrun, 1992). O contato direto pode ocorrer verticalmente (Hames-Kocabas et al., 2008) ou horizontalmente (Doméjean et al., 2010), enquanto que o contato indireto pode ocorrer por meio de objetos, como utensílios diversos, colheres (Köhler e Bratthall, 1978), xícaras, brinquedos (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992), chupetas (Nelson-Filho et al., 2009) ou escovas dentais contaminadas por bactérias cariogênicas (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992; Nelson Filho et al., 2006; Aysegul et al., 2007; Bezirtzoglou et al., 2008; Boylan et al., 2008; Balappanavar et al., 2009).

A detecção e identificação dos estreptococos do grupo mutans tem sido efetuada por meio de técnicas de cultura microbiana (Seki et al., 2002; Wan et al., 2003; Bezirtzoglou et al., 2008; Doméjean et al., 2010) e identificação bioquímica (Shklair e Keene, 1974; Beighton et al., 1991; Azevedo e Zelante, 1994; Bezirtzoglou et al., 2008), bacteriocinotipagem (Davey e Rogers, 1984; Azevedo, 1988; van Loveren et al., 2000), microscopia eletrônica de varredura (Nelson-Filho et al., 2006; Peixoto et al., 2009; Poggio et al., 2009) e por técnicas de biologia molecular (Mattos-Graner et al., 2001; Okada et al., 2002; Longo et al., 2003; Guo et al., 2006; Franco e Franco et al., 2007; Rodis et al., 2009; Choi et al., 2009), entre outras.

Quando se emprega técnicas de cultura microbiana, a porcentagem de recuperação de *S. mutans* e de *S. sobrinus* em amostras de saliva e de biofilme dentário depende, em parte, do meio de cultura empregado (Emilson e Bratthall, 1976; Dasanayake et al., 1995; Hildebrandt e Bretz, 2006).

Diferentes meios de cultura sólidos ou líquidos têm sido utilizados para a detecção de estreptococos do grupo mutans na saliva e no biofilme dentário, tais como o ágar Mitis Salivarius Bacitracina – MSB (Gold et al., 1973; Torres et al., 1993; Tedjosasongko e Kozai, 2002), MS (Carlsson, 1968), MC, BCY (Ikeda, 1972), MM10 (Syed e Loesche, 1972), TYCSB (van Palestein Hendelman et al., 1983), TYC, TYCB (Schaeken et al., 1986), MS-SOB para *S. sobrinus* (Hirasawa e Takada, 2002; 2003), MS-MUT (Hirasawa e Takada, 2003), MS-MUTV para *S. mutans* (Takada e Hirasawa, 2005), o *Tryptone-Yeast extract-Cysteine-Sucrose-Bacitracin* – TYCSB (Wan et al., 2003), o ágar Sacarose-Bacitracina (SB-20) (Davey e Rogers, 1984; Torres et al., 1993; Hofling et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Spolidorio et al., 2003; Motisuki et al., 2005) e o ágar Sacarose-Bacitracina Modificado (Azevedo, 1988; Ito et al., 1993; Azevedo e Zelante, 1994; Nelson-Filho et al., 1996; Azevedo et al., 1998; De Rossi et al., 2005; Sato et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; Peixoto et al., 2009), entre outros.

Deve-se ressaltar que a utilização de meios de cultura seletivos, de fácil preparação, que permitam a diferenciação entre *S. mutans* e *S. sobrinus* é de fundamental relevância na área da Cariologia, principalmente para o estudo de populações com elevado risco à cárie. No entanto, embora saiba-se que o meio SB-20 modificado, por ser incolor, facilita a diferenciação e a contagem de *S. mutans* e *S sobrinus* (Azevedo e Zelante, 1994; Sato et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006), não há trabalhos publicados, até o momento, avaliando comparativamente os meios de cultura SB-20 e SB-20 modificado, a fim de verificar se a substituição da sacarose pelo açúcar cristal poderia afetar a eficácia do meio de cultura original. O meio de cultura SB-20M, sem a adição de ágar, também tem sido pouco estudado. Além disso, não há trabalhos comparando os meios MSB e SB-20 modificado na contagem de unidades formadoras de colônias e na diferenciação morfológica e bioquímica de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*.

Pelo exposto, os objetivos do presente estudo foram:

1) Avaliar a eficácia do meio de cultura SB-20 modificado (SB-20M) na diferenciação morfológica de colônias de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*, obtidos pela técnica da espátula de madeira, comparativamente à análise bioquímica das colônias isoladas, em 145 crianças de 6 a 12 anos de idade (Capítulo 1).

2) Comparar os meios de cultura SB-20, SB-20M e MSB na quantificação (contagem) de unidades formadoras de colônias e na diferenciação morfológica e bioquímica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, na saliva de 20 crianças de 4 a 12 anos de idade (Capítulo 2).

3) Empregar o meio de cultura SB-20M sem ágar, denominado Caldo Sacarose-Bacitracina modificado (CaSaB-20M) para avaliar a viabilidade de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) *in vitro* e a viabilidade de estreptococos do grupo mutans *in vivo*, nas cerdas de escovas dentais, após diferentes tempos de secagem (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA ENTRE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*, NO MEIO DE CULTURA SB-20 MODIFICADO (SB-20M).

O meio de cultura SB-20 foi proposto em 1984 por Davey e Rogers, tendo como base o meio de De Stoppelaar et al. (1967), e vem sendo empregado por vários pesquisadores (Davey e Rogers, 1984; Torres et al., 1993; Azevedo et al., 1993; Hofling et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Spolidorio et al., 2003; Motisuki et al., 2005; Aysegül et al., 2007). Sendo um meio de cultura seletivo é formulado com a adição de altas concentrações de sacarose, a fim de facilitar o crescimento dos estreptococos do grupo mutans, e de altas concentrações de bacitracina, para inibir o crescimento de outros estreptococos da cavidade bucal (Hildebrandt e Bretz, 2006).

Ito et al. (1993) e Azevedo e Zelante (1994) publicaram estudos propondo a substituição da sacarose por açúcar cristal no meio SB-20, reduzindo o custo da preparação desse meio de cultura, que foi chamado de ágar SB-20 modificado. Esse meio foi empregado em diversos estudos por nosso grupo de pesquisa (Azevedo, 1988; Azevedo e Zelante, 1994; Nelson-Filho et al., 1996; Azevedo et al., 1998; De Rossi et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; 2009; Peixoto et al., 2009).

O meio SB-20 modificado pode ser utilizado também sob a forma de meio líquido, sem o ágar, denominado de Caldo Sacarose Bacitracina Modificado, possibilitando o desenvolvimento de biofilme bacteriano sobre a superfície das cerdas de escovas dentais (Sato et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006), chupetas (Nelson-Filho et al., 2009) e aparelhos ortodônticos removíveis e fixos (Lessa et al., 2007; Bagatin-Rossi, 2007; Magno et al., 2008; Peixoto et al., 2009).

A identificação das diferentes espécies de estreptococos do grupo mutans, presentes em amostras de saliva ou de biofilme, inicialmente é baseada no reconhecimento das diferenças morfológicas das colônias que se desenvolveram no meio de cultura seletivo. O meio de cultura SB-20, por ser transparente, possibilita facilmente a diferenciação com base na morfologia das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus* (Davey e Rogers, 1984).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia do meio de cultura SB-20 modificado pela substituição da sacarose por açúcar cristal (SB-20M) na diferenciação morfológica de colônias de *S. mutans* e *S. sobrinus*, comparativamente à identificação bioquímica (biotipagem).

MATERIAL E MÉTODOS

Participaram do estudo 145 crianças da Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, de 6 a 12 anos de idade, de ambos os gêneros, com boa saúde geral verificada por meio da realização de anamnese detalhada, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: não estar sendo submetida a tratamento odontológico e não estar fazendo uso de antibióticos ou soluções anti-sépticas por um período mínimo de 3 meses, para que não houvesse interferência nos resultados. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido, assinado pelos responsáveis pelas crianças.

Todos os procedimentos microbiológicos foram efetuados no laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Após um período de pelo menos 2 horas da última escovação (Torres et al., 1993), foram colhidas amostras de saliva não-estimulada das 145 crianças pela técnica da espátula de madeira proposta por Köhler e Brattall (1979), durante 1 minuto, seguido de semeadura em placas contendo meio de cultura SB-20M, preparado como descrito a seguir.

Preparo do meio de cultura SB-20M (Ágar Sacarose Bacitracina Modificado)

Composição:

Casitone.....Difco.....15,0g
Extrato de levedura.....Difco.....5,0g
L-Cisteína.....Merck.....0,2g
Sulfito de sódio.....Merck.....0,1g
Acetato de sódio.....Reagen.....20,0g
Açúcar cristal.....200,0g
Ágar-ágar.....Difco.....15,0g
Água destilada.....qsp..... 1.000,0mL

O meio de cultura SB-20 (Davey e Rogers, 1984), seletivo para estreptococos do grupo mutans, foi preparado com as modificações propostas por Ito et al. (1993) e Azevedo e Zelante (1994), no qual a sacarose foi substituída por açúcar cristal.

Por meio da utilização de uma balança elétrica, com exceção do ágar e da sacarose, os componentes foram pesados e colocados em um cálice adicionado com 1.000,0mL de água destilada, sendo dissolvidos com auxílio de bastão de vidro. Ao ágar e à sacarose, pesados e colocados em balão de Erlenmeyer, foi adicionada a solução obtida, lavando-se as paredes do balão. A seguir, os balões foram tamponados com algodão, identificados e autoclavados a 120ºC, por 20 minutos, sendo a autoclave aberta cuidadosamente, logo em seguida, para evitar a caramelização do açúcar. Após o resfriamento até cerca de 50ºC, a bacitracina (Sigma, Laboratory INLAB, Rio de Janeiro, Brasil, COD. 2430814614) foi adicionada na concentração final de 0,2UI por mL de meio e homogeneizada, em câmara de fluxo laminar. Assepticamente, o meio obtido foi vertido em placas de Petri de 20x100mm esterilizadas, em volumes de 20,0mL. Após a solidificação, as placas foram mantidas em refrigerador a 4ºC, sendo utilizadas no período máximo de 7 dias uma vez que, decorrido esse período, a bacitracina perde a sua atividade antimicrobiana.

Semeadura e Incubação

As amostras de saliva, obtidas com espátula de madeira, foram semeadas na superfície do meio de cultura. A seguir, as placas foram incubadas a 37ºC, em microaerofilia, pela técnica da chama da vela, durante 72 horas.

Quantificação (contagem) de unidades formadoras de colônias e identificação morfológica das espécies de estreptococos do grupo mutans: *S. mutans* e *S. sobrinus*

A identificação presuntiva e a contagem das ufc das 145 amostras de saliva foram efetuadas em lupa estereoscópica sob luz refletida, com aumento de 20X, colocando-se as placas contendo o meio de cultura SB-20M (meio claro) sobre um fundo preto, a fim de ressaltar as características das colônias, tendo como base as seguintes características morfológicas das colônias:

- *S. mutans:* colônias com superfície granular, semelhante a vidro moído, podendo apresentar ou não uma gota cintilante de polissacáride.

- *S. sobrinus*: colônias opacas branco-leitosas circulares ou com diferentes formas estreladas, podendo algumas vezes penetrar no meio de cultura e estarem circundadas com halo branco-leitoso apresentando, com freqüência, gotas de polissacáride.

A contagem das unidades formadoras de colônias desenvolvidas no meio SB-20M foi efetuada por um único examinador experiente calibrado (Kappa>0,8).

Identificação bioquímica das espécies de estreptococos do grupo mutans: *S. mutans* e *S. sobrinus*

Foram escolhidas, aleatoriamente, colônias com morfologia macroscópica característica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, as quais foram transferidas para tubos contendo meio de cultura Tioglicolato de sódio, sem glicose e sem indicador (Tio's), cultivadas em microaerofilia, pela técnica da chama de vela, a 37ºC, por 24 horas, ativando as cepas para a identificação bioquímica (biotipagem).

Tioglicolato de Sódio sem Glicose e sem Indicador (Tio's) - Composição

Extrato de levedura..... 5,0g
Casitone.....15,0g
Cistina-L.....0,25g
Cloreto de sódio.....2,50g
Ácido tioglicólico.....0,30mL
Ágar.....0,75g

Para o seu preparo foram pesados 24,0g do produto comercial (*Thioglycollate medium without Dextrose or Indicator* - Difco), colocados em balão de Erlenmeyer, sendo adicionados 1.000,o mL de água destilada. Após homogeneização e aquecimento até a fusão do ágar, o meio foi distribuído em tubos de 12x120mm, em volumes de cerca de 5,0mL por tubo, esterilizados a 120^0C por 20 minutos.

Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: fermentação do açúcar (manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e manitol+2UI de bacitracina), resistência à bacitracina e produção de peróxido de hidrogênio. As provas foram efetuadas como preconizado por Shklair e Keene (1974) e Whittenbury (1964), com as modificações propostas por Ito et al. (1993), que ao invés de utilizar meios líquidos agregou ágar e efetuou as provas em meios sólidos. As amostras foram semeadas nas placas de Petri contendo os meios sólidos, empregando a técnica descrita por Steers et al. (1959-1960) e utilizada por Watanabe et al. (2008).

Para a realização das provas bioquímicas, as amostras foram semeadas da forma descrita a seguir.

O meio base empregado para avaliar a fermentação de açúcar foi o Tio's, com adição de 0,75g de ágar para 1.000,0mL e solução de púrpura de bromocresol (indicador de pH, na faixa de 5,2 a 6,8), com a seguinte composição:

Púrpura de bromocresol .....(Merck)..... 1,6g
NaOH – 1N 0,6mL
Álcool etílico .....(Copercana)..... q.s.p. 100,0mL

A 1,6g de púrpura de bromocresol, foram adicionados, em um cálice, 0,6mL de solução de NaOH a 1N, para dissolução, sendo adicionados 5,0mL de álcool etílico. A seguir, a solução foi transferida a um balão volumétrico e o volume completado para 100,0mL com álcool etílico.

O meio Tio's acrescido de ágar e de 1,0% da solução de bromocresol foi distribuído em balões de 100mL. A seguir, a cada balão foi acrescido um dos seguintes açúcares, na concentração de 2,0%: manitol, sorbitol, rafinose e melibiose. Após autoclavar os balões contendo os meios, a um dos balões contendo Manitol foram acrescidos 2UI de bacitracina por 100ml de meio (ágar manitol Bacitracina).

A prova da produção de peróxido de hidrogênio foi realizada conforme descrito Whittenbury (1964), modificada pela adição de 0,5% de *Bacto Yeast Extract* (Difco) no meio *Tryptic Soy Agar* (Difco), com a seguinte composição:

Extrato de carne (BBL)..... 0,5g
Extrato de levedura (Difco)..... 0,5g
Tween 80 (Difco)..... 0,05mL
Sulfato de Manganês (Merck)..... 0,01g
Ágar (Difco)..... 1,5g
Água destilada.....q.s.p..... 90,0mL

O meio base foi dissolvido em água e, após ajuste do pH para 7,2 foi esterilizado em autoclave a 120ºC por 20 minutos. A seguir, ao meio ainda quente foram adicionados 5,0mL de uma mistura de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada esterilizada, em partes iguais, e aquecido a 100ºC durante 15 minutos, em banho-maria. Uma solução de 0,1g de paradianisidina (Merck) em 5,0mL de água destilada esterilizada, também aquecida a 100ºC durante 15 minutos, foi adicionada ainda quente e, em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri 60x20mm.

A resistência à bacitracina foi avaliada no ágar Tio's, sem a solução alcoólica de púrpura de bromocresol. Após a preparação, o meio foi esterilizado e resfriado a cerca de 50ºC, em condições assépticas em fluxo laminar, quando foram adicionados 2,0% da solução de bacitracina para obter a concentração final de 2,0U/mL. O meio foi vertido em placas de Petri de 20x100mm, sendo utilizado para semeadura das amostras.

Após semeadura das amostras com a técnica de de Steers, as placas foram incubadas por um período de 72 horas, a 37ºC, em atmosfera de CO_2 obtida pelo método da chama de vela. A fermentação dos açúcares foi considerada positiva quando observou-se coloração amarela no local de semeadura dos microrganismos. A produção de peróxido de hidrogênio (reação positiva) foi detectada quando observava-se coloração marrom escuro ou preto no local de semeadura dos microrganismos. A resistência à bacitracina foi considerada positiva quando houve crescimento no local de semeadura dos microrganismos.

A Tabela 1 apresenta as características bioquímicas (biotipagem) empregadas para a identificação das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Tabela 1 – Características bioquímicas (biotipagem) empregadas para a identificação das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*

Provas Bioquímicas	***S. mutans***	***S. sobrinus***
Fermentação de Manitol	+	+
Fermentação de Sorbitol	+	+ *
Fermentação de Rafinose	+	-
Fermentação da Melibiose	+	-
Fermentação de Manitol+2UI Bacitracina	+	+
Resistência à Bacitracina	+	+
Peróxido de hidrogênio	+	-

(*) Algumas cepas podem dar resultados negativo.

A figura 1A-L ilustra a metodologia empregada para a identificação bioquímica.

Os resultados obtidos após as identificações morfológicas e bioquímicas foram comparados empregando o teste x^2 (Programa GMC versão 8.1; www.forp.usp.br/restauradora/gsc/gmc.html). O nível de significância adotado foi de 5%.

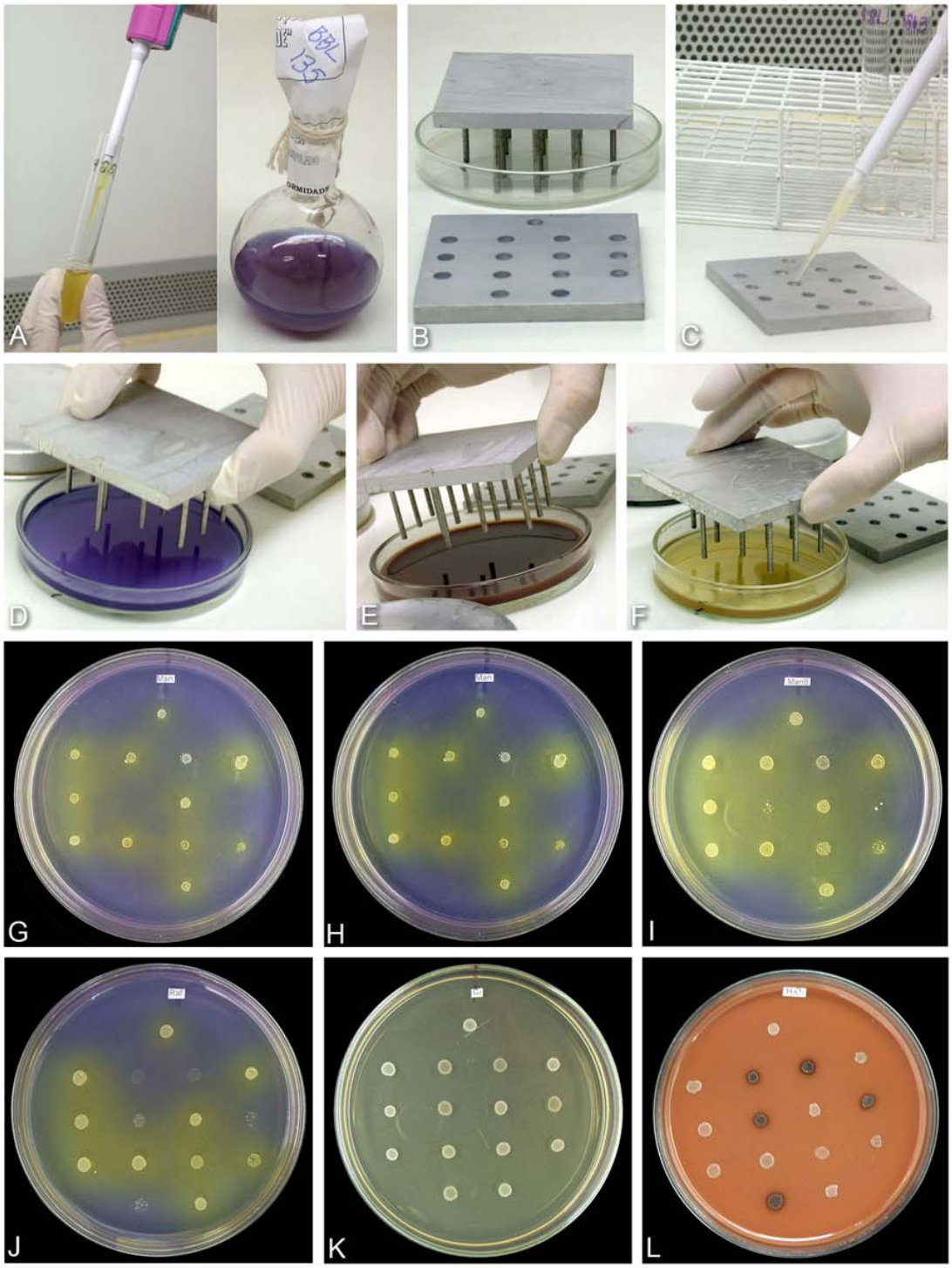

Figura 1 - Metodologia empregada para a identificação bioquímica de *S. mutans* e *S. sobrinus*

A- Cultivo das cepas em tubos de ensaio contendo o meio Tio's, para biotipagem. Meio base com indicador (púrpura de bromocresol) empregado para as provas de fermentação de açúcar.
B- Carimbo de Steers, empregado para semeadura das amostras.
C- Colocação das amostras, na base do carimbo de Steers, para semeadura.
D- Semeadura das amostras para biotipagem, em meio base com indicador para a fermentação de açúcar.
E- Semeadura das amostras para biotipagem, em meio para a prova de produção de peróxido de hidrogênio.
F- Semeadura das amostras para biotipagem, em meio para a prova de resistência à bacitracina.
G-J- Provas de fermentação dos açúcares Sorbitol, Manitol, Manitol+Bacitracina e Rafinose.
K- Prova de resistência à bacitracina.
L- Prova de produção de peróxido de hidrogênio.

RESULTADOS

O aspecto morfológico das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus* no meio de cultura SB-20M pode ser observado na figura 2 (A-H).

Como qualquer meio de cultura seletivo, o meio SB-20M permite, em pequena escala, o crescimento de outras espécies de microrganismos. No entanto, estes contaminantes são facilmente distinguíveis das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus* neste meio de cultura (Figura 2H).

De acordo com a morfologia das colônias observada em microscópio estereoscópico, foi efetuada a contagem de 4.904 ufc, nos 145 pacientes, das quais 4.794 ufc eram *S. mutans* (97,76%) e 110 *S. sobrinus* (2,24%). Um total de 93 colônias com morfologia característica (71 de *S. mutans* e 22 de *S. sobrinus*) foram submetidas às provas bioquímicas para comprovação da identidade microbiana (Tabela 2).

Observou-se que das 71 colônias com morfologia positiva para *S. mutans*, 68 foram também positivas nas provas bioquímicas. Assim, a biotipagem confirmou que em 95,8% dos casos as colônias de *S. mutans* foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M.

Das 22 colônias com morfologia positiva para *S. sobrinus*, 21 foram também positivas nas provas bioquímicas, evidenciando que a biotipagem confirmou que em 95,5% dos casos as colônias de *S. sobrinus* foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M.

Não foi observada diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre a identificação morfológica no meio SB-20M e a identificação bioquímica (biotipagem), para ambos os microrganismos avaliados.

Tabela 2 – Número e porcentagem de ufc de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, no meio SB-20M e na biotipagem

Biotipo do grupo mutans	**Identificação Morfológica (número de ufc)**	**Identificação Bioquímica (número de ufc)**	
		Biotipagen positiva	**Biotipagen negativa**
S. mutans	4.794 (97,76%)	68 (95,8%)	3 (4,2%)
S. sobrinus	110 (2,24%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)
Total	4.904 (100,0%)	89 (95,7%)	4 (4,3%)

ufc: unidades formadoras de colônia

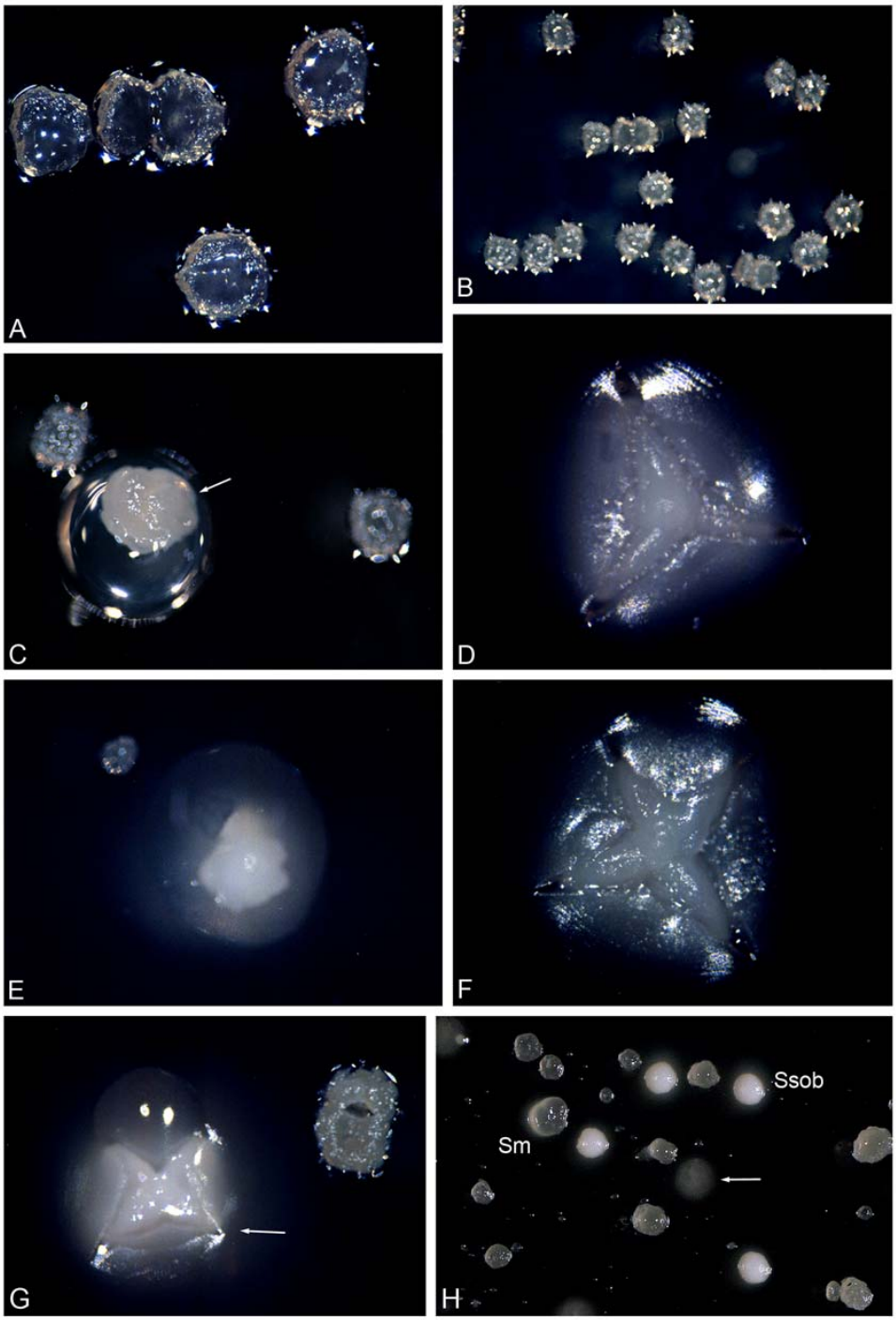

Figura 2 - Aspecto morfológico de *S. mutans* e de *S. sobrinus* no meio de cultura SB-20M

A, B- Aspecto morfológico de *S. mutans*: colônias pequenas, duras, translúcidas e rugosas, aderidas ao meio, com o aspecto típico de vidro moído; **C** - Colônias de *S. mutans* típicas e colônia de *S. sobrinus* (seta) apresentando-se branca-leitosa, com uma gota transparente e cintilante de polissacarídeo; **D**- Colônia de *S. sobrinus* com centro elevado e forma estrelada (3 pontas), penetrando no meio de cultura e circundada por halo branco-leitoso; **E** - Aspecto morfológico de *S. sobrinus*: colônia branca-opaca, circundada por halo branco-leitoso; **F**- Aspecto morfológico de *S. sobrinus*, evidenciando colônia estrelada, com forma de 4 pontas, penetrando no meio de cultura e circundada por halo branco-leitoso; **G** - Colônia de *S. mutans* típica e colônia de *S. sobrinus* (seta) de cor branca-leitosa, maior que a de *S. mutans*, com forma estrelada, adentrando no meio de cultura, com uma gota transparente e cintilante de polissacarídeo; **H** - Colônias de *S. mutans* (Sm) e de *S. sobrinus* (Ssob). Colônia de microrganismo contaminante (seta), facilmente distinguível no meio SB-20M.

DISCUSSÃO

Dentre as diferentes espécies de microrganismos que compõem o grupo mutans, as duas mais comumente isoladas da espécie humana (Hamada e Slade, 1980; Hofling et al., 1999) e mais diretamente envolvidas no processo da cárie dental são os *S. mutans* e os *S. sobrinus* (Hamada e Slade, 1980; Loesche, 1986; Fejerskov e Kidd, 2005; Saito et al., 2009). Assim, a contagem diferencial dos níveis desses dois microrganismos, na cavidade bucal, torna-se relevante.

A identificação de *S. mutans* é geralmente efetuada com base na morfologia das colônias em diferentes meios de cultura seletivos (Svanberg e Krasse, 1990) e nas características bioquímicas do microrganismo (Gold et al., 1973; Schaeken et al., 1986; Hirasawa e Takada, 2003).

No entanto, a diferenciação morfológica entre *S. mutans* e *S. sobrinus* na maior parte dos meios de cultura é dificultada (De Soet et al., 1990). Por essa razão, testes imunológicos (De Soet et al., 1990), bioquímicos (Shklair e Keene, 1974; Beighton et al., 1991; Azevedo e Zelante, 1994) ou de biologia molecular (Oho et al., 2000; Mattos-Graner et al., 2001; Okada et al., 2002; Longo et al., 2003; Guo et al., 2006; Rodis et al., 2009) tornam-se necessários, o que consome um período extenso de tempo.

Apesar da aplicação de testes de biologia molecular ser importante para se efetuar a diferenciação de *S. mutans* e *S. sobrinus*, os testes bioquímicos com essa finalidade apresentam resultados satisfatórios. Em 2004, Amoroso et al., baseados nos resultados de sensibilidade e especificidade, relataram que a biotipagem por meio de testes bioquímicos e a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) apresentaram a mesma eficácia na detecção dos *S. mutans* e *S. sobrinus*. Em 2007, Franco e Franco et al. também compararam a eficácia dos testes bioquímicos e da técnica PCR, na identificação e diferenciação de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, observando que os resultados de ambas as técnicas foram semelhantes. Esses resultados fornecem subsídios para a utilização da técnica bioquímica para a identificação microbiana.

Em função dos relatos publicados na literatura específica de que os meios SB-20 e SB-20M, por serem incolores, facilitam a identificação morfológica e a contagem das colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus* (Azevedo e Zelante, 1994; Sato et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006), o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do meio SB-

20M em diferenciar morfologicamente as ufc de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, comparativamente à identificação bioquímica (biotipagem), na saliva de pacientes.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a biotipagem confirmou, em mais de 95% dos casos, que as colônias de *S. mutans* e de *S. sobrinus* foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M, não sendo observada diferença significante ($p>0,05$) entre a identificação morfológica no meio SB-20M e a identificação bioquímica, para ambos os microrganismos avaliados. Essa alta concordância entre os resultados morfológicos e bioquímicos pode ser explicada pelo fato de que o meio SB-20M, sendo incolor, facilita a identificação morfológica das colônias branco-opacas de *S. sobrinus*, as quais apresentam, em quase todos os casos, um halo esbranquiçado circundando-as. A observação desse halo já havia sido relatada por Huis in't Veld et al. (1982). Também, nesse meio de cultura as colônias de *S. mutans* são sempre circulares, enquanto que as colônias de *S. sobrinus* podem se apresentar sob a forma circular e estrelada, como observado no presente estudo, facilitando a diferenciação morfológica das duas espécies.

No meio SB-20M, empregado no presente estudo, adicionou-se 20,0% de sacarose sob a forma de açúcar cristal, o que permitiu que as bactérias continuassem utilizando, no ágar, a mesma forma de substrato que geralmente está presente no meio bucal. Esse fator possivelmente é o responsável pela observação, nesse meio, de colônias grandes, com diferenças morfológicas bem evidentes, particularmente entre *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Assim como nos outros meios seletivos, no meio SB-20M ocorre, em menor escala, o crescimento de outros cocos. No entanto, nesse meio as diferenças morfológicas entre os estreptococos do grupo mutans e outros cocos é tão marcante que, indiscutivelmente, facilita a diferenciação apenas pela avaliação macroscópica.

Embora novos meios de cultura seletivos venham sendo desenvolvidos, como por exemplo o MS-MUT para *S. mutans* e MSSOB para *S. sobrinus* (Hirasawa and Takada, 2002; 2003), evidenciando eficácia, em sua maioria são meios de difícil preparação e de custo mais elevado. Por outro lado, o meio SB-20M é econômico e de fácil preparação, podendo ser armazenado à temperatura ambiente por até 3 meses, desde que a bacitracina e o açúcar cristal sejam adicionados apenas no momento do uso.

Um fator de fundamental importância é que o meio SB-20M possibilita o crescimento e a identificação de *S. sobrinus*, o que não ocorre com os outros meios de cultura. O *S. sobrinus* apresenta maior prevalência em indivíduos onde há falta de conscientização com relação ao consumo de carboidratos, levando em conta que a colonização por esse microrganismo é mais sacarose-dependente que os S. *mutans* (Gibbons et al., 1986). Por ser um microrganismo altamente acidogênico, sua identificacão e contagem são fundamentais na determinação do risco e da atividade de cárie.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que o método morfológico empregando o meio de cultura SB-20M foi confiável na identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

CAPÍTULO 2

COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA SB-20, SB-20M E MSB NA QUANTIFICAÇÃO (CONTAGEM) DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS E NA DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* E *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*.

Nos últimos anos, a prevalência da cárie dental vem sofrendo alterações, observando-se que um pequeno segmento da população é responsável pela maior parte das lesões (Glass, 1982; Winter, 1990; White et al., 1995). Este fato despertou interesse na avaliação do risco de cárie (Anderson, 2002), uma vez que pode-se detectar os indivíduos mais propensos ao desenvolvimento de lesões e submetê-los a um programa preventivo ou terapêutico direcionado (Pitts, 1998).

Tendo em vista o importante papel desempenhado pelos estreptococos do grupo mutans na etiologia da cárie dental (Loesche, 1986; Ajdic et al., 2002; Berkowitz, 2003; McNeill e Hamilton, 2003; Guo et al., 2006; Takahashi e Nyvad, 2008), sua quantificação e identificação é relevante (Svanberg e Krasse, 1990) em estudos epidemiológicos e de intervenção precoce (Hildebrandt e Bretz, 2006). Do ponto de vista microbiológico, a porcentagem de recuperação de estreptococos do grupo mutans na saliva e no biofilme dentário depende do meio de cultura empregado (Emilson e Bratthall, 1976; Little et al., 1977; van Palestein Helderman, 1983).

A contagem e identificação de estreptococos do grupo mutans tradicionalmente tem sido realizada com base na morfologia das colônias em meios de cultura seletivos, como o ágar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB) (Gold et al., 1973; Westergren e Krasse, 1978; Torres et al., 1993; Tedjosasongko e Kozai, 2002; Hildebrandt e Bretz, 2006; Tankkunnasombut et al., 2009; Fonteles et al., 2009), SB-20 (Davey e Rogers, 1984; Torres et al., 1993; Azevedo et al., 1993; Hofling et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Spolidorio et al., 2003; Motisuki et al., 2005) e SB-20 modificado (Azevedo, 1988; Azevedo e Zelante, 1994; Nelson-Filho et al., 1996; Azevedo et al., 1998; De Rossi et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; Peixoto et al., 2009).

No entanto, algumas cepas e sorotipos são inibidos em alguns meios de cultura seletivos (Liljemark et al., 1976; Staat, 1976), tendendo a subestimar a quantidade de estreptococos do grupo mutans (Emilson e Bratthall, 1976; Little et al., 1977). Além disso, a diferenciação morfológica entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, em meios de cultura como o MSB, é mais difícil de ser realizada (Davey e Rogers, 1984).

Tendo em vista que não há trabalhos publicados, até o momento, comparando os meios de cultura SB-20 e SB-20 modificado (SB-20M), a fim de verificar se a substituição da sacarose pelo açúcar cristal poderia afetar a eficácia do meio de cultura original, nem comparando a eficácia dos meios SB-20M e MSB, o objetivo do presente estudo foi comparar esses meios de cultura na contagem de ufc e na diferenciação morfológica e bioquímica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, na saliva de crianças.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da Amostra

Participaram do estudo 20 crianças na faixa etária de 4 a 12 anos de idade da Creche Lar Santana - Ribeirão Preto - SP e da clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, de ambos os gêneros, com boa saúde geral, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: não estar sendo submetida a tratamento odontológico e não estar fazendo uso de antibióticos ou de soluções anti-sépticas por um período mínimo de 3 meses, para que não houvesse interferência nos resultados. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos indivíduos participantes da pesquisa e da Diretora Geral da creche.

Todos os procedimentos microbiológicos foram efetuados no laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Colheita de Saliva e Processamento Microbiológico (Cultura Microbiana)

Foram colhidos aproximadamente 2,0mL de saliva não estimulada de cada paciente em tubos de ensaio contendo pérolas de vidro, decorridos pelo menos 2 horas da última escovação (Torres et al., 1993). Alíquotas de 0,5mL de cada amostra, após desfibrinização em agitador Mixtron-Toptronix (São Paulo - SP) durante 1 minuto, foram submetidas à diluição decimal em série até 10^{-4}, em 4,5 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,0. Alíquotas de 50µL da saliva pura e diluída foram depositadas, em pontos eqüidistantes, nas placas de Petri contendo os meios de cultura SB-20 (Davey e Rogers, 1984), SB-20M (Ito et al., 1993; Azevedo e Zelante, 1994) e MSB (Gold et al., 1973), seletivos para estreptococos do grupo mutans. A semeadura foi efetuada com micropipeta, de acordo com o micrométodo proposto por Westergren e Krasse (1978).

Preparo do meio de cultura Mitis Salivarius Bacitracina (MSB)

Composição:

Triptose..... 10,0g
Proteose Peptona..... 5,0g
Dextrose..... 1,0g
Sacarose.....50,0g
Fosfato dipotássico..... 4,0g
Azul de tripan..... 0,075g
Cristal violeta..... 0,0008g
Ágar..... 15,0g
Água destilada.....1.000,0mL

Foram pesados em balança elétrica 90,0g do produto desidratado *Mitis salivarius agar* (Difco) e adicionados 150,0g de sacarose (Difco). Os componentes foram colocados em balão de Erlenmeyer, acrescido de água destilada em quantidade suficiente e homogeneizados. O balão foi então fechado com tampão de algodão revestido por cápsula de papel e esterilizado em autoclave a 120^{0}C, por 15 minutos. Após manutenção em banho-maria para esfriamento gradual, quando a temperatura atingiu cerca de 45°C foram acrescidos 0,2UI de bacitracina/mL de meio e 1,0% de telurito de potássio. Em seguida, 20,0 mL do meio de cultura foram distribuídos com pipetas graduadas esterilizadas, em placas de Petri de 10x60mm, as quais foram armazenadas por no máximo 7 dias, em refrigerador.

Os meios de cultura SB-20 e SB-20M foram preparados como descrito anteriormente no Capítulo 1.

Após semeadura nos meios SB-20, SB-20M e MSB as placas foram incubadas em microaerofilia, pela técnica da chama de vela, durante 72 horas, a 37°C.

A identificação presuntiva e a contagem das ufc obtidas das 20 amostras foram efetuadas em microscópio estereoscópico (Nikon - Japan) sob luz refletida, com aumento de 20X. Para a contagem nos meios SB-20 e SB-20M (meios claros) as placas foram colocadas sobre um fundo preto, a fim de ressaltar as características das colônias, tendo como base as seguintes características morfológicas das colônias:

- *S. mutans:* colônias com superfície granular, semelhante a vidro moído, podendo apresentar ou não uma gota cintilante de polissacáride.
- *S. sobrinus*: colônias opacas branco-leitosas circulares ou com diferentes formas estreladas, podendo algumas vezes penetrar no meio de cultura e estarem circundadas com halo branco-leitoso apresentando, com freqüência, gotas de polissacáride.

A contagem das unidades formadoras de colônias foi efetuada por um único examinador experiente calibrado (Kappa>0,8).

Colônias com características morfológicas de *S. mutans* e de *S. sobrinus* foram escolhidas aleatoriamente nos meios SB-20M e MSB e transferidas para tubos contendo o meio Tio's, incubados em microaerofilia pela técnica da chama de vela, a 37ºC, por 24 horas, para identificação bioquímica (biotipagem). Foram efetuadas as provas bioquímicas, de acordo com Shklair e Keene (1974) e Whittenbury (1964), com modificações propostas por Ito et al. (1993): fermentação do manitol, sorbitol, rafinose e melibiose, resistência à bacitracina, hidrólise da esculina, hidrólise da arginina e produção de peróxido de hidrogênio.

Para esse estudo, a prova do peróxido de hidrogênio foi modificada pela adição de 0,5% de *Bacto Yeast Extract* (Difco) no meio *Tryptic Soy Agar* (Difco).

As figuras 3 e 4 apresentam os fluxogramas da metodologia empregada.

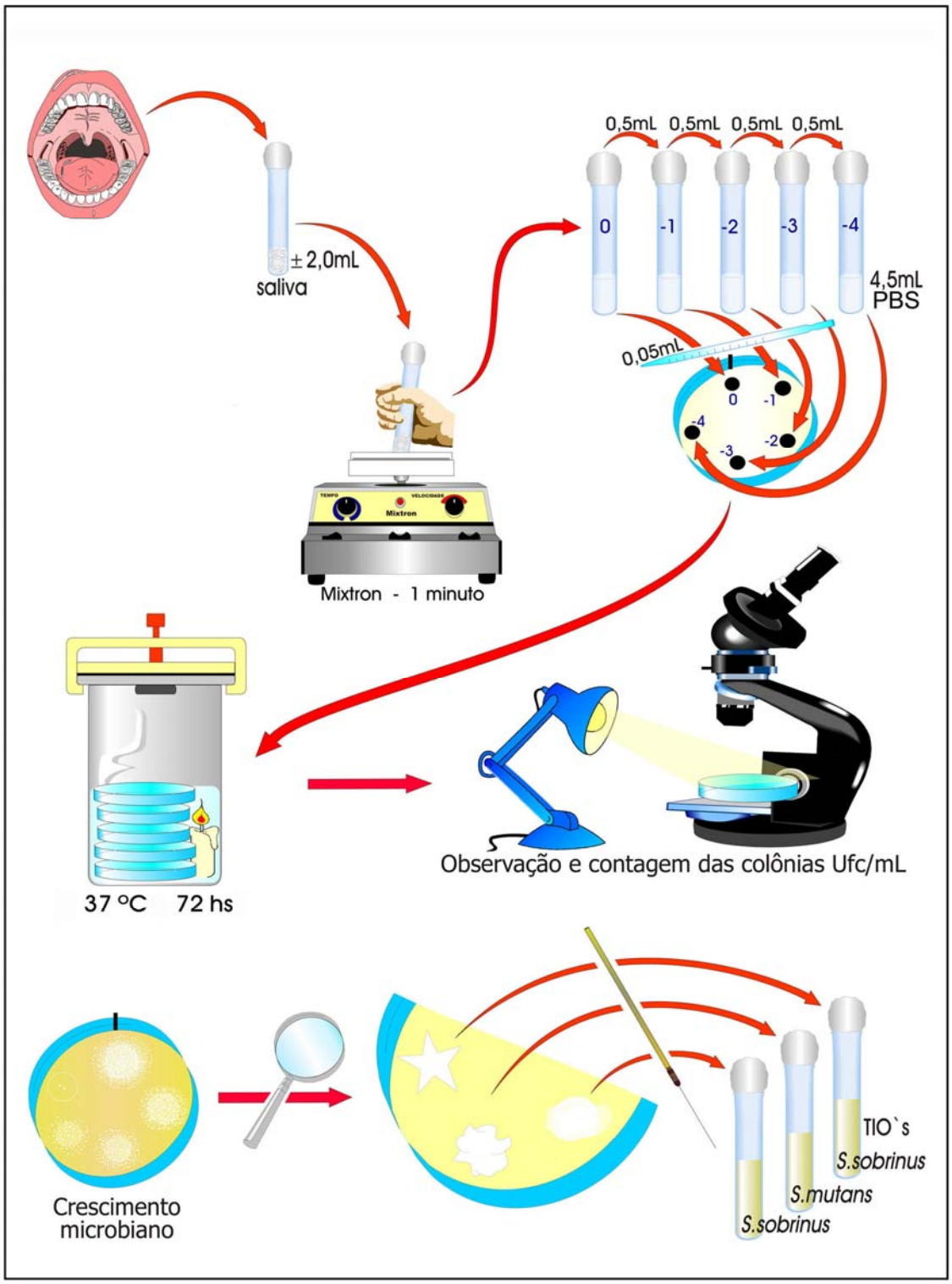

Figura 3 - Fluxograma da metodologia empregada.

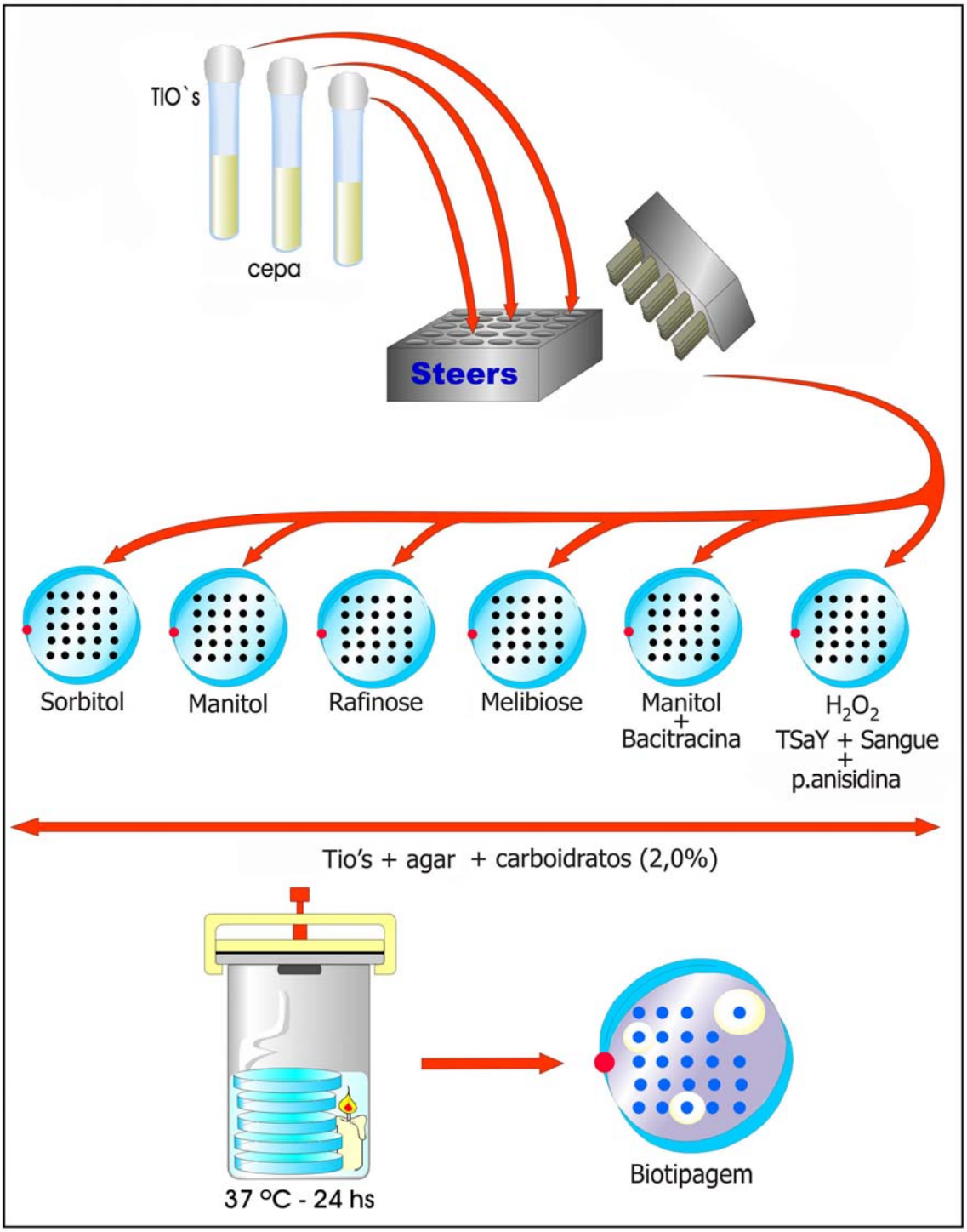

Figura 4 - Fluxograma da metodologia empregada.

Análise Estatística

Os resultados obtidos após a contagem de ufc e identificação morfológica e bioquímica foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste de Wilcoxon e o teste exato de Fisher, por meio do programa estatístico GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), com nível de significância 5%.

RESULTADOS

Comparação dos meios de cultura SB-20 e SB-20M na contagem de estreptococos do grupo mutans

A mediana do número de ufc de estreptococos do grupo mutans que foram contadas no meio de cultura SB-20 foi de 1.100.000, enquanto que no meio SB-20M foi de 1.000.000, não havendo diferença estatisticamente significante (p=0,687) entre os dois meios (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado da comparação entre os meios de cultura SB-20 e SB-20M, com relação à contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans

Microrganismo	Meio SB-20	Meio SB-20M	*P**
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Estreptococos do grupo mutans	1.100.000 600.000-1.930.000	1.000.000 750.000- 2.000.000	0,687

*****valor de *p* para o teste de Wilcoxon.
Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M = mediana, Q1 = primeiro quartil e Q3 = terceiro quartil.

Comparação dos meios de cultura SB-20M e MSB na contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans

O resultado da comparação entre os meios de cultura SB-20M e MSB em relação à contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans está apresentado na Tabela 4. A mediana do número de ufc de estreptococos do grupo mutans detectadas no meio de cultura SB-20M foi de 1.000.000 e no meio MSB foi de 600.000, sendo esta diferença estatisticamente significante (p<0,0001).

Tabela 4 – Resultado da comparação entre os meios de cultura SB-20M e MSB, com relação à contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans

Microrganismo	Meio SB20-M	Meio MSB	*P**
	M(Q1-Q3)	M(Q1-Q3)	
Estreptococos do grupo mutans	1.000.000 380.000-3.400.000	600.000 134.000- 1.600.000	<0,0001

***** valor de *p* para o teste de Wilcoxon.
Os valores encontram-se expressos como M(Q1-Q3), onde M = mediana, Q1 = primeiro quartil e Q3 = terceiro quartil.

A figura 5 (A-F) ilustra o aspecto morfológico dos *S. mutans* e *S. sobrinus* nos meios de cultura MSB e SB-20M.

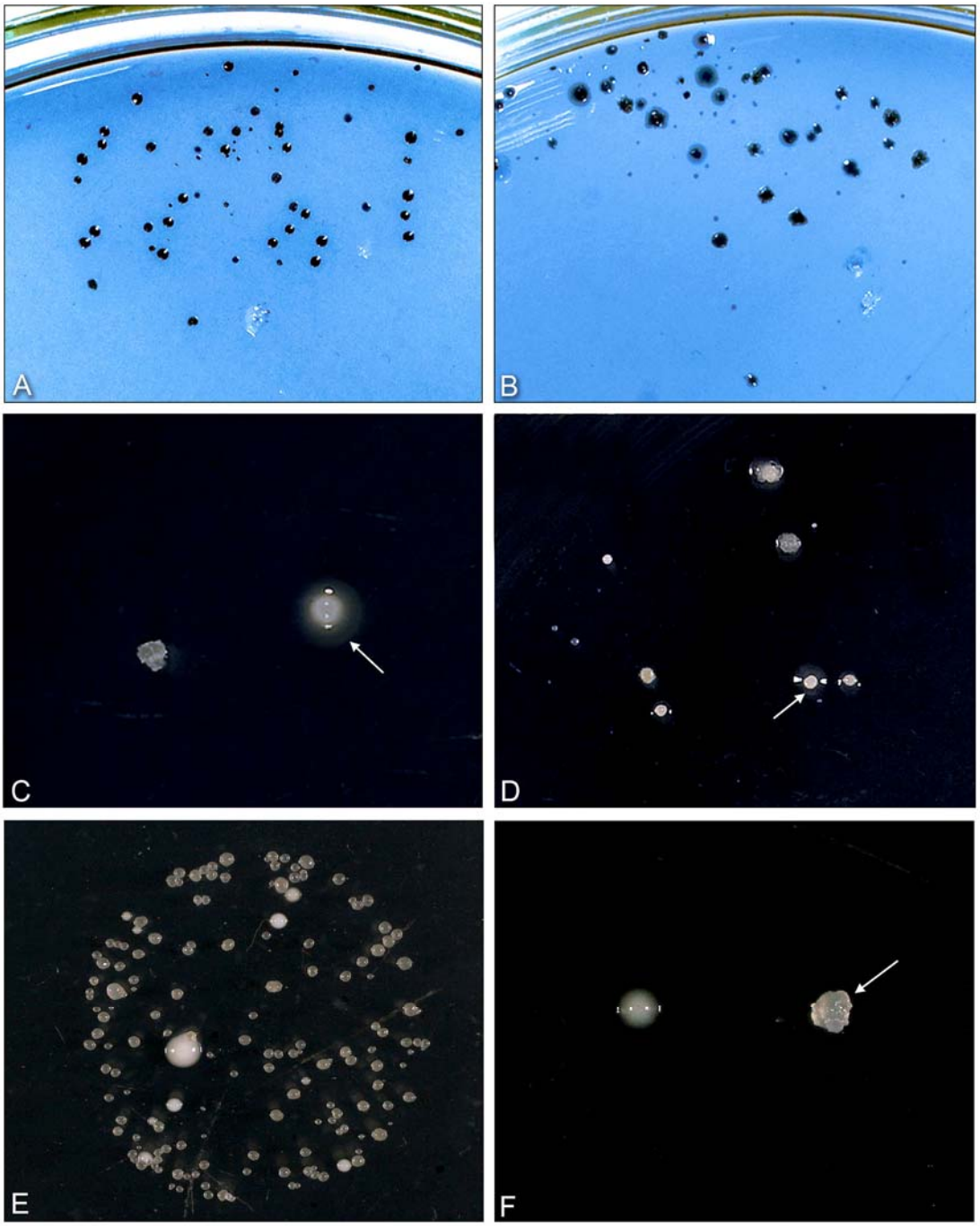

Figura 5 - Aspecto morfológico de *S. mutans* e de *S. sobrinus* nos meios de cultura MSB e SB-20M

A, B- Colônias desenvolvidas no meio de cultura MSB.

C, D- Colônias desenvolvidas no meio de cultura SB-20M, onde pode-se distinguir macroscopicamente os *S. sobrinus*, com facilidade.

E- Semeadura na diluição 1/10, no meio SB-20M, com microrganismos contaminantes facilmente distinguíveis.

F- Colônia de *S. mutans* (seta) e microrganismo contaminante, facilmente distinguível no meio SB-20M.

Comparação da eficácia dos meios SB20-M e MSB na diferenciação morfológica e bioquímica de *S. sobrinus e S. mutans*

Um total de 54 colônias com morfologia característica (28 de *S. sobrinus* e 26 de *S. mutans*) de cada meio de cultura foram submetidas às provas bioquímicas, para comprovação da identidade microbiana.

Comparando os dados da morfologia das colônias com os resultados das provas bioquímicas, observou-se que das 28 colônias com morfologia característica para *S. sobrinus* no meio SB-20M, 26 foram também positivas nas provas bioquímicas, evidenciando que a biotipagem confirmou que em 93% dos casos as colônias de *S. sobrinus* foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M.

Por outro lado, no meio MSB, das 28 colônias com morfologia positiva para *S. sobrinus*, apenas 6 foram positivas nas provas bioquímicas, ou seja, houve a confirmação da identidade microbiana em apenas 21% dos casos (Tabela 5).

Tabela 5 – Biotipagem de *S. sobrinus* isolados nos meios de cultura SB-20M e MSB

Meios de cultura	Identificação Bioquímica	
	Biotipagen positiva	Biotipagen negativa
SB-20M	26 (93%)	2 (7%)
MSB	6 (21%)	22 (79%)

Com relação aos *S. mutans*, a tabela 6 mostra que das 26 colônias com morfologia característica no meio SB-20M, 22 foram positivas nas provas bioquímicas, enquanto que das 26 colônias no meio MSB, 18 foram positivas nestas provas. Assim, a biotipagem confirmou que no meio SB-20M, em 85% dos casos as colônias de *S. mutans* foram corretamente caracterizadas e no meio MSB a caracterização foi correta em 69% dos casos.

Tabela 6 – Biotipagem de *S. mutans* isolados nos meios de cultura SB20-M e MSB

Meios de cultura	Identificação Bioquímica	
	Biotipagen positiva	Biotipagen negativa
SB20-M	22 (85%)	4 (15%)
MSB	18 (69%)	8 (31%)

A análise estatística mostrou que houve diferença significante entre os dois meios de cultura na caracterização (identificação) dos *S. sobrinus* (p<0,0001) e dos *S. mutans* (p=0,011). Os resultados podem ser melhor observados nas figuras 6 e 7.

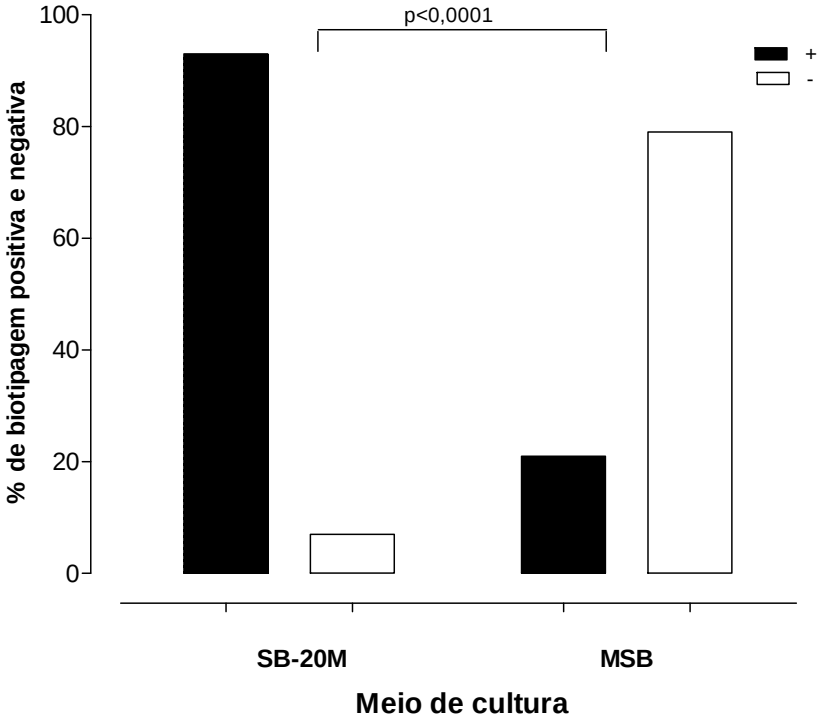

Figura 6 – Comparação da porcentagem de biotipagem positiva e negativa de *S. sobrinus* isolados nos meios de cultura SB-20M e MSB, por meio do teste de Fisher.

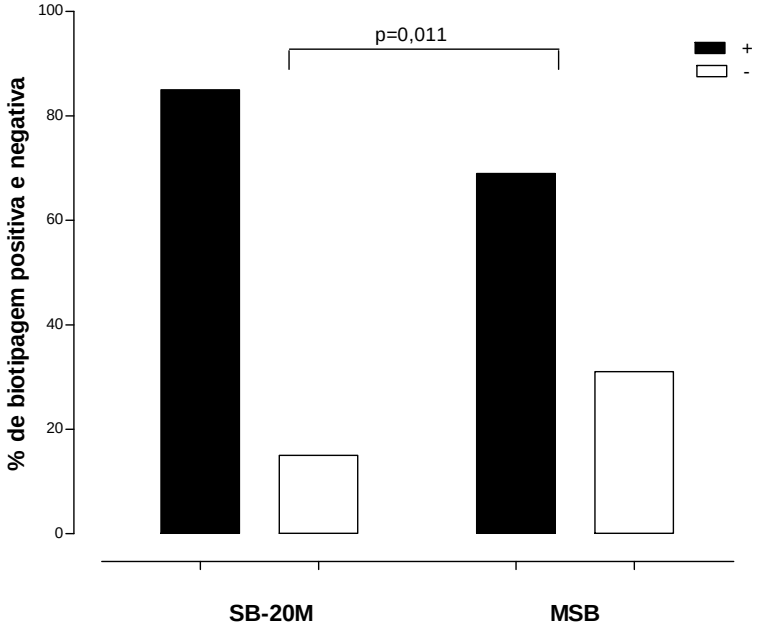

Figura 7 – Comparação da porcentagem de biotipagem positiva e negativa de *S. mutans* isolados nos meios de cultura SB-20M e MSB, por meio do teste de Fisher.

DISCUSSÃO

Da comparação dos meios de cultura SB-20 e SB-20M na contagem de estreptococos do grupo mutans.

Apesar dos meios de cultura SB-20 (Davey e Rogers, 1984; Torres et al., 1993; Azevedo et al., 1993; Hofling et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Spolidorio et al., 2003; Motisuki et al., 2005) e SB-20 modificado (Azevedo, 1988; Azevedo e Zelante, 1994; Nelson-Filho et al., 1996; Azevedo et al., 1998; De Rossi et al., 2005; Nelson-Filho et al., 2006; Peixoto et al., 2009) terem sido empregados em inúmeros trabalhos de pesquisa, não houve a preocupação, até o momento, de se comparar a eficácia desses 2 meios.

De acordo com os resultados do presente estudo, não houve diferença significante no número de ufc de estreptococos do grupo mutans que foram contadas nos meios de cultura SB-20 e SB-20M, evidenciando que a substituição da sacarose pelo açúcar cristal não alterou a eficácia do meio na detecção de estreptococos do grupo mutans.

Da comparação dos meios de cultura SB-20M e MSB na contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans e na diferenciação morfológica e bioquímica de *S. sobrinus* e *S. mutans*.

No presente estudo, observou-se diferença estatisticamente significante entre os meios de cultura SB-20M e MSB, com relação à contagem de ufc de estreptococos do grupo mutans, evidenciando que o meio SB-20M possibilitou a contagem de maior número de colônias desses microrganismos. Esses resultados oferecem respaldo para as afirmativas de Dasanayake et al. (1995) e Hildebrandt e Bretz (2006) de que o crescimento e o padrão de recuperação de estreptococos do grupo mutans salivares, qualitativa e quantitativamente, varia de acordo com o meio de cultura empregado. Por essa razão, deve-se ter cuidado ao se efetuar comparações entre estudos publicados que empregaram meios de cultura diferentes para a quantificação de estreptococos do grupo mutans (Hildebrandt e Bretz, 2006), e sempre fazer a opção por meios seletivos mais eficazes na quantificação microbiana.

Embora os meios de cultura seletivos elevem a detecção do microrganismo alvo, algumas limitações existem também na identificação e quantificação diferencial das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*. O ágar MSB, amplamente utilizado na literatura (Hildebrandt e Bretz, 2006; Tankkunnasombut et al., 2009; Fonteles et al., 2009), suprime seletivamente os *S. sobrinus (sorotipo g)*, em comparação aos *S. mutans* (Gold et al., 1973; Takada e Hirasawa, 2005). Segundo Hildebrandt e Bretz (2006), *S. mutans* e *S. sobrinus* foram recuperados em níveis inferiors no meio MSB, em comparação a outros meios seletivos (TYCSB e HLR-S).

Os meios MS e MSB são também altamente inibitórios, em geral não permitindo o crescimento das cepas sorotipo *a* (Little et al., 1977). Além disso, a adição de telurito de potássio resulta em uma redução no número de colônias, variando de 6% para as cepas do sorotipo *d* a 25% para as cepas do sorotipo *b* (Syed e Loesche, 1973).

Deve-se salientar, também, que o ágar MSB apresenta coloração azul, em função da presença do cristal violeta e do azul de tripan em sua composição, o que dificulta a observação do halo esbranquiçado característico dos *S. sobrinus*. Por outro lado, o meio SB-20M, empregado no presente estudo, por ser transparente e incolor possibilita, com facilidade, a diferenciação das colônias das espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, tendo como base suas características morfológicas, como aspecto e coloração da colônia, presença de polissacáride e presença de halo branco leitoso.

Em 1993, Torres et al. avaliaram a eficácia do meio de cultura Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), preconizado por Gold et al. (1973), comparativamente ao meio SB-20, preconizado por Davey e Rogers (1984), na detecção de ufc de estreptococos do grupo mutans na saliva e no biofilme dentário de adolescentes brasileiros. Embora os 2 meios de cultura avaliados tenham sido adequados para a detecção e contagem de ufc do grupo mutans, esses autores sugeriram o emprego do ágar SB-20, por detectar maior variedade de biotipos e facilitar a identificação presuntiva de *Streptococcus sobrinus*, quando comparado ao MSB.

No presente estudo, observou-se diferença estatisticamente significante entre os meios SB-20M e MSB também na identificação bioquímica. A biotipagem confirmou que em 93% dos casos as colônias de *S. sobrinus* foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M, enquanto que essa porcentagem foi de apenas 21% no meio MSB. Com relação aos *S. mutans*, a biotipagem confirmou que em 85% dos casos as colônias foram corretamente caracterizadas no meio SB-20M, enquanto que no meio MSB a caracterização foi correta em 69% dos casos.

Pelo exposto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, concluiu-se que o meio de cultura SB-20M apresenta vantagens quando comparado ao meio MSB pois, além de ser de custo menor e ser de fácil preparação, possibilitou a contagem de maior número de colônias de estreptococos do grupo mutans e a identificação morfológica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, com facilidade. Esses dados foram comprovados pela análise bioquímica das colônias.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175) E DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS NAS CERDAS DE ESCOVAS DENTAIS, EMPREGANDO O MEIO DE CULTURA CASAB-20M (CALDO SACAROSE-BACITRACINA MODIFICADO) - ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO*.

A transmissão da microbiota cariogênica pode ocorrer por meio de contatos diretos, via saliva (Tedjosasongko e Kozai, 2002), ou por meio de contatos indiretos (Newbrun, 1992). O contato direto pode ocorrer verticalmente (Hames-Kocabas et al., 2008) ou horizontalmente (Doméjean et al., 2010), enquanto que o contato indireto pode ocorrer por meio de objetos, como utensílios diversos, colheres (Köhler e Bratthall, 1978), xícaras, brinquedos (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992), chupetas (Nelson-Filho et al., 2009) ou escovas dentais contaminadas por bactérias cariogênicas (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992; Nelson Filho et al., 2006).

As escovas dentais são primariamente empregadas para desorganizar e remover o biofilme dentário. O resultado de uma pesquisa realizada pelo Instituto de Tecnologia de Massachussets, nos Estados Unidos, foi publicado em janeiro de 2003 no site do programa *Fantástico* (Globo.com, 2003), contendo as 5 invenções mais importantes do milênio, de acordo com a população. A classificação obtida foi a seguinte: forno de microondas (5º lugar), telefone celular (4º lugar), computador pessoal (3º lugar), automóvel (2º lugar) e escova de dentes (1º lugar). Verifica-se, assim, que a escova é um ítem considerado de fundamental importância pela população em geral.

As escovas dentais são fabricadas e comercializadas isentas de microrganismos (Glass e Jensen, 1988; Kozai et al., 1989). No entanto, após serem utilizadas, tornam-se contaminadas por microrganismos (Bezirtzoglou et al., 2008; Boylan et al., 2008; Ankola et al., 2009), incluindo bactérias (Pinto et al., 1997; Glass e Jensen, 1988; Kozai et al., 1989; Verran et al., 1997; Suido et al., 1998; Nelson-Filho et al., 2000; Warren et al., 2001; Kennedy et al., 2003; Quirynen et al., 2003; Nelson-Filho et al., 2004; Nelson-Filho et al., 2006; Aysegul et al., 2007; Efstratiou et al., 2007; Boylan et al., 2008; Balappanavar et al., 2009), vírus (Glass et al., 1994; Zarski e Leroy, 1999), fungos

e leveduras (Feo, 1981; Bunetel et al., 2000; Bezirtzoglou et al., 2008), presentes na cavidade bucal e no meio ambiente externo (Caudry et al., 1995).

Segundo Balappanavar et al. (2009), as escovas dentais contaminadas podem desempenhar um papel importante na transmissão de doenças locais e sistêmicas.

Tendo em vista que a Odontologia Moderna enfatiza a prevenção de doenças e o controle de infecção, as escovas dentais deveriam ser corretamente armazenadas, desinfetadas e trocadas após períodos de tempo regulares. Por esse motivo, alguns autores têm salientado a necessidade do controle microbiano nas escovas dentais (Nelson-Filho et al., 2000; Nelson-Filho et al., 2006; Aysegul et al., 2007; Bezirtzoglou et al., 2008; Boylan et al., 2008; Balappanavar et al., 2009; Ankola et al., 2009).

A retenção e sobrevivência de microrganismos cariogênicos nas cerdas das escovas dentais representa uma possível causa de contaminação e de recontaminação da cavidade bucal (Wetzel et al., 2005; Bezirtzoglou et al., 2008). Além disso, o uso de escovas dentais contaminadas pode servir como uma forma de disseminação de microrganismos na cavidade bucal (Balappanavar et al., 2009), intra ou inter-indivíduos (Svanberg, 1978; Glass e Jensen, 1988). Esses fatos justificam a importância de se avaliar a viabilidade de microrganismos nas escovas dentais, a fim de propor métodos para sua desinfecção.

Pelo exposto, empregando o meio de cultura SB-20M sem ágar, denominado de Caldo Sacarose Bacitracina Modificado (CaSaB-20M), os objetivos do presente estudo foram:

- Avaliar *in vitro* a viabilidade de *Streptococcus mutans* (ATCC25175) nas cerdas de escovas dentais, após diferentes períodos de secagem.

- Avaliar *in vivo* a viabilidade de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais utilizadas por crianças de 4 a 8 anos de idade, após diferentes períodos de secagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo *in vitro*

Um total de 45 escovas dentais infantis (Johnson Jr, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) foram retiradas de sua embalagem original e imersas em Becker com uma suspensão contendo *Streptococcus mutans* (cepa ATCC 25175), na concentração de 1.720.000 unidades formadoras de colônias por mL (escala 0,5 de McFarland), durante 4 minutos. Em seguida, as escovas foram enxaguadas em água de torneira esterilizada por 5 segundos, pelo mesmo pesquisador, e divididas em 9 grupos (n=5).

Logo após a lavagem, as escovas do Grupo 1 (controle) foram submetidas ao processamento microbiológico. As escovas dos Grupos 2 a 9 foram mantidas à temperatura ambiente por 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, respectivamente, fixadas em uma base de isopor, a fim de evitar o contato direto entre elas, mantidas presas com a cabeça voltada para cima, permitindo a circulação de ar para secagem das mesmas pelos períodos de tempo estabelecidos, previamente ao processamento microbiológico.

Como controle adicional, 5 escovas dentais foram retiradas de suas embalagens originais e submetidas imediatamente ao processamento microbiológico, sem serem contaminadas. Este procedimento foi realizado com a finalidade de verificar se as escovas dentais não apresentavam contaminação oriunda do processo de fabricação industrial e embalagem.

Preparo do CaSaB-20M (Caldo Sacarose Bacitracina Modificado)

Composição:

Casitone.....Difco.....15,0g
Extrato de levedura.....Difco.....5,0g
L-Cisteína.....Merck.....0,2g
Sulfito de sódio.....Merck.....0,1g
Acetato de sódio.....Reagem.....20,0g
Açúcar cristal.....200,0g
Água destilada.....qsp..... 1.000,0mL

O Caldo Sacarose Bacitracina Modificado (CaSaB-20M) foi preparado tendo como base o meio de cultura SB-20 (Davey e Rogers, 1984), modificado como preconizado por Ito et al. (1993) e Azevedo e Zelante (1994), onde a sacarose foi substituída por açúcar cristal (SB-20M), porém sem adição de ágar.

Cultura microbiana

Decorridos os diferentes períodos de secagem, as escovas de cada grupo foram colocadas, individualmente, nos tubos de ensaio de 25X150mm contendo 10,0mL do meio de cultura CaSaB-20M, em posição vertical, de forma que as cerdas ficassem totalmente submersas no meio de cultura, porém sem tocar nas paredes do tubo. Os tubos foram, então, fechados com algodão e incubados por 3 a 4 dias, a 37°C.

Decorrido o período de incubação, as escovas foram submetidas à agitação manual no próprio meio de cultura e retiradas, cuidadosamente, do tubo de ensaio, a fim de evitar o contato das cerdas com as paredes do tubo. Para a remoção do excesso de meio de cultura retido entre as cerdas, as escovas foram batidas levemente contra a borda de um béquer, por 3 a 4 vezes.

A seguir, as escovas dentais foram analisadas por um examinador "cego", experiente e calibrado (Kappa>0,8), de todos os lados e de todos os ângulos, quanto à presença ou não de desenvolvimento de biofilme sobre a superfície das cerdas, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Nikon, Tókio, Japão), sob luz refletida, sendo efetuada a contagem das colônias/biofilmes de *S. mutans* aderidas às cerdas.

A figura 8 apresenta o fluxograma da metodologia empregada.

Para a análise estatística o número de colônias/biofilmes de *S. mutans* sobre a superfície das cerdas foi expresso de acordo com os seguintes parâmetros:

- *Escore 0:* ausência de colônias/biofilmes.
- *Escore 1:* de 1 a 50 colônias/biofilmes.
- *Escore 2:* de 51 a 100 colônias/biofilmes.
- *Escore 3:* mais de 100 colônias/biofilmes; intenso desenvolvimento bacteriano, inclusive com colônias confluentes entre as cerdas, impossibilitando a contagem exata.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, empregando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (Programa GMC 8.1; www.forp.usp.br/restauradora/gsc/gmc.html). O nível de significância adotado foi de 5%.

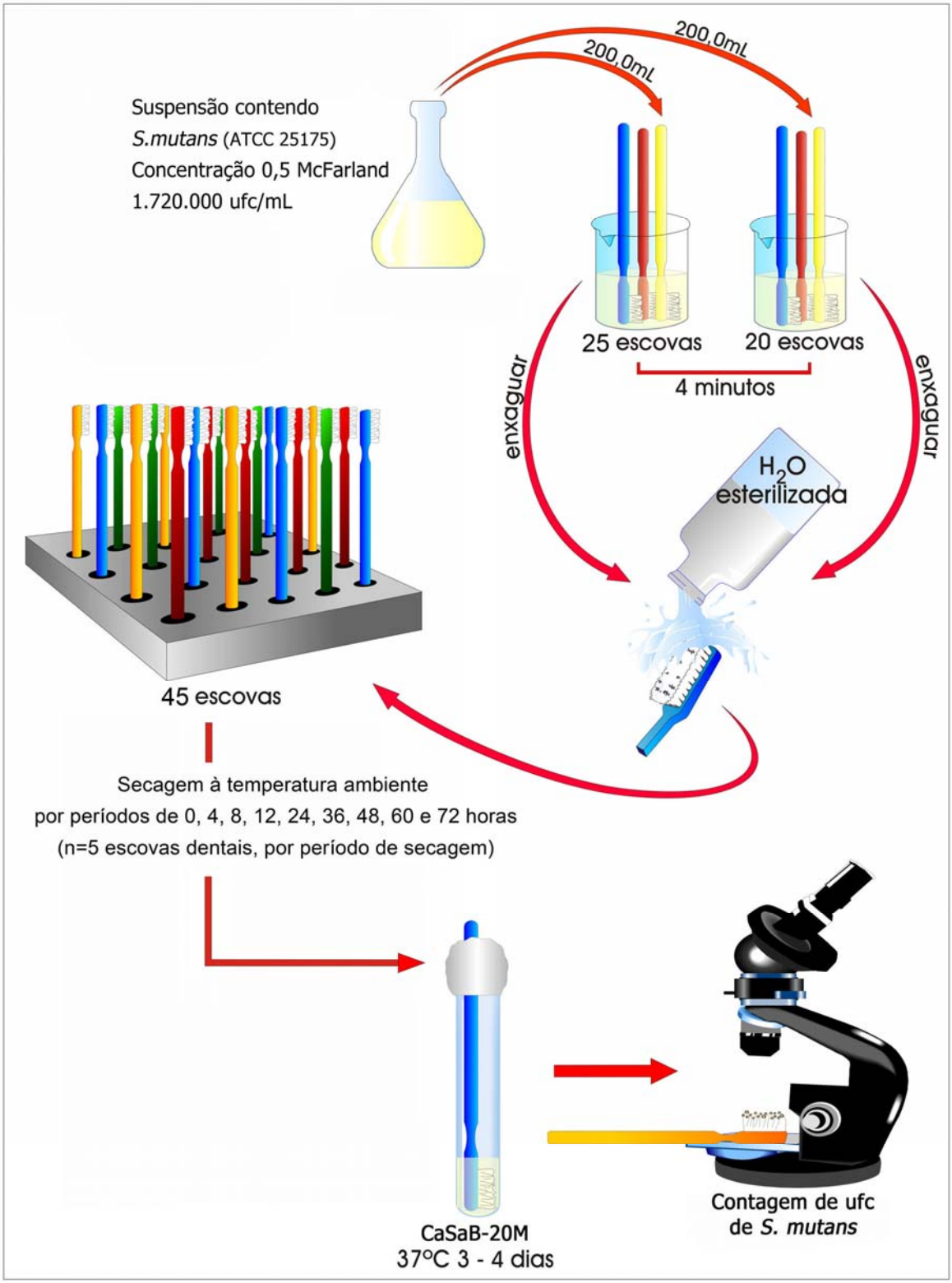

Figura 8 - Fluxograma da metodologia empregada.

Estudo *in vivo*

Participaram do estudo 20 crianças na faixa etária de 4 a 8 anos de idade da Creche Lar Santana - Ribeirão Preto - SP, do gênero feminino, com boa saúde geral evidenciada por meio de anamnese, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: não estar sendo submetida a tratamento odontológico, não estar fazendo uso de antibióticos ou de soluções anti-sépticas por um período mínimo de 3 meses, para que não houvesse interferência nos resultados, e apresentar no mínimo 10^6 estreptococos do grupo mutans por mL de saliva não estimulada (alto risco à cárie dental), determinado após semeadura de amostras de saliva no meio SB-20M (Ito et al., 1993; Azevedo e Zelante, 1994). Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos indivíduos participantes da pesquisa e da Diretora Geral da creche.

Todos os procedimentos microbiológicos foram efetuados no laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Cada criança foi submetida a uma escovação por dia, com intervalo de 3 dias entre cada escovação, totalizando 13 escovações por criança. Cada escovação foi realizada com uma escova dental nova (Colgate Baby-Barney, Colgate/Palmolive, Kolynos do Brasil Ltda., São Bernardo do Campo, São Paulo), totalizando 260 escovas dentais, divididas em 13 grupos (n=20).

As escovações foram efetuadas na creche, no início do período da manhã, por um único pesquisador, pela técnica de Stillman modificada (Guedes-Pinto et al., 2003), realizada por um único profissional, incluindo dentes e língua, sem dentifrício. O tempo de escovação empregado foi de um minuto, padronizado com auxílio de cronômetro digital.

Após cada escovação, as escovas foram enxaguadas em água de torneira, recolhidas, codificadas e o excesso de líquido foi removido das cerdas batendo-se levemente o cabo da escova dental de encontro à borda da pia.

Logo após a lavagem, as escovas do Grupo 1 (controle) foram submetidas ao processamento microbiológico. As escovas dos Grupos 2 a 13 foram mantidas à temperatura ambiente por 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 e 48 horas, respectivamente, fixadas em uma base de isopor, a fim de evitar o contato direto entre elas, mantidas presas com a cabeça voltada para cima, permitindo a circulação de ar para secagem das mesmas pelos períodos de tempo estabelecidos, previamente ao processamento microbiológico.

Com a finalidade de verificar se as escovas dentais não apresentavam contaminação oriunda do processo de fabricação industrial e embalagem, como controle adicional 5 escovas dentais foram retiradas de suas embalagens originais e submetidas imediatamente ao processamento microbiológico, sem serem contaminadas.

Cultura microbiana

Decorridos os diferentes períodos de secagem, as escovas dos grupos 2 a 13 foram submetidas ao processamento microbiológico (semeadura, incubação, contagem e identificação) da mesma maneira descrita anteriormente para o estudo *in vitro*.

Confirmação da identidade microbiana

A confirmação de que os microrganismos presentes nas cerdas, contados sob a forma de colônias/biofilmes, realmente eram pertencentes ao grupo mutans, foi realizada escolhendo-se aleatoriamente 4 a 5 colônias/biofilmes presentes nas cerdas de 4 a 5 escovas dentais de cada grupo, as quais foram transferidas para tubos contendo 2,0mL de Tampão Fosfato Sorensen (PBS) e pérolas de vidro. Após serem submetidos à agitação em aparelho Mixtron-Toptronix (São Paulo - SP), em velocidade 4, por 2 minutos, foi efetuada a semeadura de alíquotas da suspensão resultante no meio de cultura SB-20M, seletivo para estreptococos do grupo mutans. Decorridas 72 horas de incubação em microaerofilia, a 37°C, foi verificado o desenvolvimento de ufc, sendo efetuadas a identificação bioquímica de acordo com Shklair e Keene (1974) e Whittenbury, (1964), com modificações propostas por Ito et al. (1993): fermentação do manitol, sorbitol, rafinose e melibiose, resistência à bacitracina, hidrólise da esculina, hidrólise da arginina e produção de peróxido de hidrogênio. Para esse estudo, a prova do peróxido de hidrogênio foi modificada pela adição de 0,5% de *Bacto Yeast Extract* (Difco) no meio *Tryptic Soy Agar* (Difco).

Adicionalmente, foi avaliada a quantidade de polissacarídeo extracelular presente nas cerdas das escovas dentais, nos diferentes grupos, de acordo com os seguintes escores:

- *Escore 0:* ausência de polissacarídeo extracelular.
- *Escore 1:* presença de polissacarídeo extracelular recobrindo até 50% da superfície das cerdas.

- *Escore 2:* presença de polissacarídeo extracelular recobrindo mais que 50% da superfície das cerdas.

Os dados foram avaliados estatisticamente por meio do teste não-paramétrico de Wilcoxon, empregando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Estudo *in vitro*

Observou-se que à medida que o tempo de secagem aumentou, o número de colônias/biofilmes sofreu redução. De acordo com a tabela 7, verificou-se presença de contaminação por *S. mutans* em todas as escovas dos Grupos 1 (controle) e 2 (secagem por 4 horas). Além disso, 4 das 5 escovas do Grupo 3 (8 horas de secagem) estavam contaminadas, com números de colônias/biofilmes de 50 a mais de 100 (Figura 9). A partir do período de 12 horas de secagem, não houve desenvolvimento de *S. mutans* nas cerdas das escovas.

Tabela 7 - Número de colônias/biofilmes de *Streptococcus mutans* nas cerdas de escovas dentais, após diferentes períodos de secagem

Escova dental	G 1 (controle)	G 2 (4 hs)	G 3 (8 hs)	G 4 (12 hs)	G 5 (24 hs)	G 6 (36 hs)	G 7 (48 hs)	G 8 (60 hs)	G 9 (72 hs)
1	+100	+100	82	0	0	0	0	0	0
2	+100	+100	88	0	0	0	0	0	0
3	+100	+100	50	0	0	0	0	0	0
4	+100	+100	+100	0	0	0	0	0	0
5	+100	85	0	0	0	0	0	0	0

G= grupo.

Os Grupos 1 a 3 não apresentaram diferença estatisticamente significante entre si ($p>0,05$), porém apresentaram diferença significante com relação aos outros grupos ($p<0,05$). A partir do período de secagem de 12 horas, houve uma diminuição significativa nos números de colônias/biofilmes de *S. mutans* ($p<0,01$), em comparação aos grupos 1 a 3.

Não foi observada contaminação microbiana nas 5 escovas dentais retiradas da embalagem original, mesmo após incubação a 37°C por 20 dias.

Figura 9 - Resumo da metodologia empregada e resultados obtidos, após cultura microbiana das escovas dentais no meio CaSaB-20M

A- Preparação do inóculo com a cepa *S. mutans* ATCC 25175.
B- Colocação das escovas dentais em Becker.
C- Contaminação das escovas dentais com o inóculo, na concentração 0,5 da escala McFarland.
D- Lavagem das escovas dentais, após contaminação por 4 minutos.
E- Manutenção das escovas em base de isopor, por diferentes tempos de secagem.
F- Caldo Sacarose Bacitracina Modificado (CaSaB-20M).
G- Colocação das escovas em tubos de ensaio de 25X150mm contendo 10,0mL do meio de cultura CaSaB-20M, fechados com algodão.
H- Escova dental representativa do Grupo 1 (controle). Presença de um grande número de colônias/biofilmes de *Streptococcus mutans* nas cerdas.
I- Escova dental representativa do Grupo 3 (secagem por 8 horas). Presença de colônias/biofilmes de *Streptococcus mutans* nas cerdas.
J, K- Escovas dentais representativas do Grupo 2 (secagem por 4 horas). Presença de um grande número de colônias/biofilmes de *Streptococcus mutans* nas cerdas.
L- Escova dental representativa do Grupo 3 (secagem por 8 horas). Presença de colônias/biofilmes de *Streptococcus mutans* nas cerdas.

Estudo *in vivo*

Todas as crianças selecionadas (100%) participaram do estudo até a sua conclusão. A tabela 8 apresenta a porcentagem de casos por escore, atribuído de acordo com o número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans presentes nas cerdas das escovas dentais de crianças, após escovação e diferentes períodos de secagem.

Tabela 8 - Porcentagem de casos por escore, de acordo com o número de colônias/biofilmes de estrepococos do grupo mutans presentes nas cerdas de escovas dentais de crianças

Escore	Períodos de Secagem (horas)													
	0	4	8	12	16	18	20	24	28	32	36	40	44	48
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20%	100%
1	-	-	-	-	-	20%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	80%	-
2	-	-	-	-	15%	15%	-	-	-	-	-	-	-	-
3	100%	100%	100%	100%	85%	65%	-	-	-	-	-	-	-	-

À medida que o tempo de secagem aumentou, o número de colônias/biofilmes sofreu redução. Nos períodos de tempo de 0, 4, 8, 12 e 16 horas, as escovas dentais apresentaram intensa contaminação microbiana (quantidades incontáveis), com predominância de escore 3, sem diferença estatisticamente significante entre esses períodos de tempo ($p>0,05$). A partir do período de 18 horas de secagem, houve uma diminuição significante na viabilidade de estreptococos do grupo mutans ($p=0,0078$), com escore predominantemente 1 nos períodos de 20, 24, 28, 32, 36, 40 e 44 horas, sem diferença significante entre esses períodos ($p>0,05$). A partir do período de 16 horas o tamanho das colônias também sofreu redução. No período de 48 horas não foi observada viabilidade microbiana em 100% dos casos, com diferença significante em comparação aos demais períodos ($p<0,05$).

Nas 5 escovas dentais removidas da embalagem original e não utilizadas (controle adicional), não observou-se contaminação microbiana, após processamento microbiológico.

A figura 10 apresenta escovas dentais representativas do crescimento microbiano nas cerdas, após escovação e diferentes períodos de secagem.

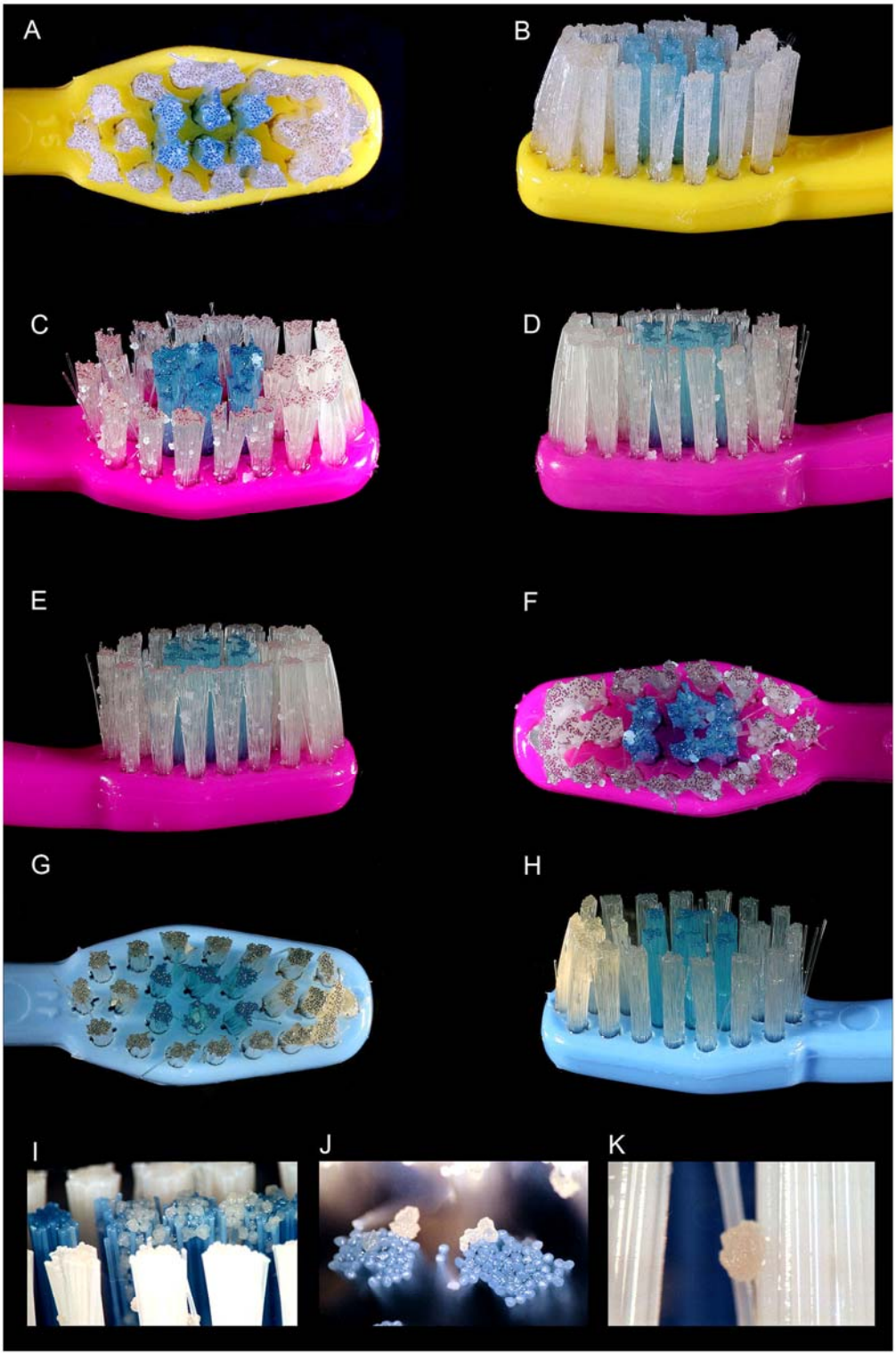

Figura 10 - Escovas dentais representativas do crescimento microbiano nas cerdas, após escovação, diferentes períodos de secagem e cultura microbiana no meio CaSaB-20M (Estudo *in vivo*)

A, B- Período de 12 horas: presença de grande número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans sobre as cerdas; **C-F**- Período de 18 horas: nesse período ainda observou-se presença de intensa contaminação das cerdas por estreptococos do grupo mutans; **G, H**- Período de 44 horas: redução na contaminação microbiana das escovas; **I-K**- Vista aproximada das colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans observadas sobre as cerdas.

De acordo com a tabela 9, polissacarídeos extracelulares foram frequentemente observados nas cerdas das escovas dentais nos períodos de secagem de 0 a 32 horas, estando presentes em maiores quantidades nos períodos de 0 a 12 horas ($p<0,05$), com gradativa redução até o período de 32 horas. Contrariamente ao que ocorreu nos períodos iniciais, não foram observados polissacarídeos extracelulares nos perídos de 36, 40 e 48 horas ($p<0,05$).

Tabela 9 - Escores da quantidade de polissacarídeos extracelulares nas presentes nas cerdas das escovas dentais de crianças, após escovação e diferentes períodos de secagem

Escore	Períodos de Secagem (Horas)													
	0	4	8	12	16	18	20	24	28	32	36	40	44	48
0	10%	10%	10%	15%	-	-	50%	75%	80%	80%	100%	100%	80%	100%
1	60%	65%	70%	70%	100%	100%	50%	25%	20%	20%	-	-	20%	-
2	30%	25%	20%	15%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as escovas tornam-se intensamente contaminadas por microrganismos após sua utilização, o que está de acordo com as observações de Glass e Jensen (1988), Kozai et al. (1989), Verran et al. (1997), Suido et al. (1998), Nelson-Filho et al. (2000), Warren et al. (2001), Quirynen et al. (2003), Nelson-Filho et al. (2004), Nelson-Filho et al. (2006), Aysegul et al. (2007), Efstratiou et al. (2007), Bezirtzoglou et al. (2008), Boylan et al. (2008), Ankola et al. (2009) e Balappanavar et al. (2009).

Do ponto de vista clínico, quando não se efetua procedimentos com a finalidade de promover a redução da contaminação microbiana das escovas dentais após sua utilização, os microrganismos sobrevivem sobre as cerdas, o que pode contribuir para a disseminação de microrganismos na cavidade bucal (Bezirtzoglou et al., 2008), no mesmo indivíduo ou entre diferentes indivíduos (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992; Pinto et al., 1997), possivelmente elevando o risco à cárie dental.

Isto pode também representar um risco significativo para alguns grupos de indivíduos, como os imunossuprimidos, transplantados e portadores de cardiopatias, nos quais as bacteriemias transitórias podem favorecer a ocorrência de endocardite bacteriana (Sconyers et al., 1973; Muller et al., 1998; Kennedy et al., 2003; Sullivan et al., 2003). Eventualmente, também pode haver contato direto entre escovas de diferentes membros da família, nos recipientes sobre a pia ou nos armários de banheiro (Newbrun, 1992).

Além disso, o controle da ocorrência de contato salivar entre indivíduos, em ambientes como creches, pré-escolas e outras instituições que abrigam crianças de idade precoce é muito difícil (Malmberg et al., 1994), podendo a escova ser trocada e/ou compartilhada, inadvertidamente. Esse fato agrava-se quando se trata de indivíduos portadores de necessidades especiais, em função do comportamento muitas vezes não colaborador, e dos diferentes níveis de comprometimento mental (Barbosa, 2003).

Outro aspecto agravante é que período de tempo no qual os estreptococos do grupo mutans permanecem viáveis nas cerdas das escovas é, ainda, controverso. Kozai et al. (1989) relataram que *S. mutans* estavam presentes nas escovas utilizadas por crianças em altos níveis ($2,55X10^4$ unidades formadoras de colônias) 6 horas após seu uso e exposição ao ar. Spolidorio et al. (2003) avaliaram a viabilidade de *S. mutans* em escovas dentais confeccionadas de materiais opacos e transparentes, por meio do método da diluição, observando que, após 8 horas, o numero de microrganismos diminuiu para 0. Nelson-Filho et al. (2004) demonstraram, *in situ*, que os *S. mutans* estavam presentes em 93% das escovas utilizadas por crianças, mesmo após 4 horas de exposição ao ar e à temperatura ambiente.

Por outro lado, Wetzel et al. (2005) observaram contaminação nas escovas dentais mesmo após 8 horas de secagem. Outros autores observaram que, embora a contaminação das cerdas por *S. mutans* sofra uma diminuição com o passar do tempo, as escovas podem estar contaminadas mesmo 24 horas após o uso (Svanberg, 1978; Bunetel et al., 2000).

De acordo com os resultados do presente estudo *in vitro*, as escovas dentais apresentaram intensa contaminação por *S. mutans* por até 8 horas. Por outro lado, no estudo *in vivo* observou-se intensa contaminação microbiana até o período de 16 horas após a escovação, com redução na viabilidade nos períodos de 20 a 44 horas e ausência de microrganismos apenas após 48 horas. Essa observação pode conduzir à

conclusão de que a secagem ao ar não é um método adequado para o controle da contaminação das cerdas das escovas, tornando necessário o uso de agentes antimicrobianos, com essa finalidade.

As diferenças observadas na viabilidade microbiana no presente estudo *in vitro* e *in vivo* podem ser explicadas pelo fato de que no estudo *in vivo* as escovas dentais foram contaminadas por cepas de microrganismos da própria cavidade bucal de crianças com alto risco à cárie dental, e não por cepas padrão que são menos agressivas. Assim, verificou-se que *in vivo* os microrganismos permaneceram viáveis por 44 horas. no estudo *in vitro*, e por até 44 horas no estudo *in vivo*.

No presente estudo *in vivo* a redução no número de colônias/biofilmes de estreptococos do grupo mutans, que ocorreu gradualmente após os diferentes períodos de secagem, foi acompanhada de redução no tamanho das colônias e de redução da produção de polissacarídeos extracelulares. Isso pode ser explicado pela redução na disponibilidade de nutrientes, associado ao ambiente desfavorável para o microrganismo, em comparação às condições da cavidade bucal. A importância dos polissacarídeos extracelulares na patogenicidade do biofilme dentário tem sido demonstrada (Schilling et al., 1992). Munro et al. (1991) evidenciaram uma forte correlação entre a presença de polissacarídeos extracelulares e a adesão de estreptococos do grupo mutans. Assim, no presente estudo a redução da produção de polissacarídeos extracelulares pode ter contribuído para a redução da viabilidade microbiana, observada com o decorrer dos períodos de secagem.

Os resultados do presente estudo mostraram que as cerdas das escovas podem reter *S. mutans* e possibilitar que esses estejam viáveis por longos períodos de tempo. Estudos adicionais são necessários para determinar a viabilidade de diferentes cepas de estreptococos do grupo mutans, incluindo os *Streptococcus sobrinus*, e de outros tipos de bactérias, vírus e fungos.

CONCLUSÕES

Considerando as condições específicas deste trabalho e com base nos resultados obtidos nas diferentes metodologias empregadas, pôde-se concluir que:

1) O método de identificação morfológica, empregando o meio de cultura SB-20M, foi confiável para a identificação de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

2) Os meios SB-20 e SB-20M foram semelhantes na quantificação (contagem) de estreptococos do grupo mutans e na identificação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*, evidenciando que a substituição da sacarose pelo açúcar cristal não alterou a eficácia do meio.

3) O meio de cultura SB-20M apresentou resultados estatisticamente superiores, quando comparado ao meio MSB, com relação à contagem de ufc e com relação à identificação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*.

4) O Caldo Sacarose-Bacitracina modificado (CaSaB-20M) permitiu avaliar a viabilidade de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais, após diferentes períodos de secagem. De acordo com o estudo *in vitro* com cepa padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), observou-se viabilidade de microrganismos nas escovas dentais por até 8 horas. Por outro lado, no estudo *in vivo*, os estreptococos do grupo mutans permaneceram viáveis por períodos superiores (44 horas).

REFERÊNCIAS*

Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savis G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. PNAS 2002;99:14434-9.

Amoroso P, Franco TCCF, Marin JM, Ávila FA. Avaliação comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* e estudo da transmissão. Cienc Odontol Bras. 2004:7(2): 30-40.

Anderson M. Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. Pediatr Dent. 2002;24:377–85.

Ankola AV, Hebbal M, Eshwar S. How clean is the toothbrush that cleans your tooth? Int J Dent Hyg. 2009 Nov;7(4):237-40.

Ayşegul O, Elgin IE, Gulcin A, Nedim S. The efficacy of chlorhexidine spray vs mouthwash in the microbial contamination of child toothbrushes. J Dent Child. 2007 Sep-Dec;74(3):177-81.

Azevedo RV, Zelante F. Streptococci of the mutans group: confirmation of intrafamilial transmission by mutacin typing. Braz Dent J. 1994;5(1):27-34.

Azevedo RVP, Freitas AC, Assed S, Silva LAB, Nelson-Filho P, Ito IY. Estreptococos do grupo mutans: Determinação do risco à cárie e da prevalência das espécies na saliva de crianças - Método da espátula. Revista de Odontopediatria. 1993 Abr/Mai/Jun; 2(2):91-6.

Azevedo RVP, Nelson-Filho P, Assed S, Ito IY. Estreptococos do grupo mutans: Isolamento, identificação e prevalência das espécies na saliva de pares mãe/filho. Rev Odontol Univ São Paulo 1998 Jan/Mar;12(1):47-50.

Azevedo RVP. O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo mutans [tese]. São Paulo: FO – Univ. de São Paulo; 1988.

Bagatin-Rossi CR. Formação de biofilme e corrosão em aparelhos disjuntores de Haas, com e sem utilização de agente antimicrobiano: estudo *in situ*. [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo; 2007.

Balappanavar AY, Nagesh L, Ankola AV, Tangade PS, Kakodkar P, Varun S. Antimicrobial efficacy of various disinfecting solutions in reducing the contamination of the toothbrush -- a comparative study. Oral Health Prev Dent. 2009;7(2):137-45.

Barbosa BMC. Avaliação da contaminação microbiana e eficácia de agentes antimicrobianos na desinfeção de escovas dentais de pacientes portadores de necessidades especiais [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP - Univ. de São Paulo; 2003.

---

* *Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2009), de acordo com o International Comitte of Medicals Journals Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: http://www.mja.com.au/public/information/uniform.html. Acesso em setembro de 2009.*

Beighton D, Hardie JM, Whiley RA. A scheme for the identification of viridans streptococci. J Med Microbiol. 1991 Dec;35(6):367-72.

Beighton D, Russel RRB, Whiley RA. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res 1991;25:174-178.

Beighton, D., Hayday, H., Russell, R.R.B. and Whiley, R.A. *Streptococcus macacae* sp. nov. from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). Int J Syst Bacteriol 1984;34, 332–335.

Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevenion of early childhood caries: a microbiologic perspective. J Can Dent Assoc 2003;69:304-7.

Bezirtzoglou E, Cretoiu SM, Moldoveanu M, Alexopoulos A, Lazar V, Nakou M. A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. J Dent. 2008 Aug;36(8):600-5.

Boylan R, Li Y, Simeonova L, Sherwin G, Kreismann J, Craig RG, Ship JA, McCutcheon JA. Reduction in bacterial contamination of toothbrushes using the Violight ultraviolet light activated toothbrush sanitizer. Am J Dent. 2008 Oct;21(5):313-7.

Bunetel L, Tricot-Doulex S, Agnani G, Bonnaure-MalletM. *In vitro* evaluation of the retention of three different types of toothbrush. Oral Microbiol Immunol 2000;15:313-6.

Carlsson, J. 1968. A numerical taxonomic study of humans oral streptococci.

Caudry SD, Klitorinos A, Chan ECS. Contaminated toothbrushes and their disinfection. J Can Dent Assoc 1995;61:511-6.

Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. Int J Paediatr Dent. 2009 Mar;19(2):141-7.

Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br J Exp Pathol 1924;5:141-7.

Coykendall, A.L. Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic, antigenic, and biochemical characteristics. J Gen Microbiol 1974:83, 327–338.

Dasanayake AP, Caufield PW, Cutter GR, Roseman JM, Köhler B. Differences in the detection and enumeration of mutans streptococci due to differences in methods. Arch Oral Biol. 1995 Apr;40(4):345-51.

Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. Arch Oral Biol 1984;29:453-60.

De Rossi M, De Rossi A, Queiroz AM, Azevedo RVP, Ito IY, Nelson-Filho P. Adequação do meio bucal e seu efeito sobre a microbiota salivar cariogênica. JBP. Revista Íbero-Americana de Odontopediatria e Odontologia do Bebê. 2005; 8(43):210-7.

De Soet JJ, Toors FA, De Graaff J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. Caries Res. 1989;23:14-7.

De Soet JJ, van Dalen PJ, Pavicic MJAMP, de Graaff J. Enumeration of mutans streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1990;28:2467-2472.

De Stoppelaar JD, van Houte J, Moor CE. The presence of dextran-forming bactéria, resembling *Streptococcus bovis* and *Streptococcus sanguis*, in human dental plaque. Arch Oral Biol. 1967;12:1199-1201.

Doméjean S, Zhan L, Denbesten PK, Stamper J, Boyce WT, Featherstone JD. Horizontal transmission of mutans streptococci in children. J Dent Res. 2010 Jan;89(1):51-5.

Duchin S, Van Houte J. Relationship of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* to incipient smooth surface dental caries in man. Arch Oral Biol 1978; 23:779-86.

Emilson CG, Bratthal D. Growth of *Streptococcus mutans* on varius selective media. J Clin Microbiol. 1976 Jul;4(1) :95-98.

Efstratiou M, Papaioannou W, Nakou M, Ktenas E, Vrotsos IA, Panis V. Contamination of a toothbrush with antibacterial properties by oral microorganisms. J Dent. 2007 Apr;35(4):331-7.

Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Ed. Santos; 2005.

Feo M. Supervivencia y desinfeccion de *Candida albicans*en el cepillo de dientes. Mycopathologia 1981;74:129-34.

Fontana M, Zero DT. Assessing patients' caries risk. J Am Dent Assoc. 2006;137:1231-9.

Fonteles CS, Guerra MH, Ribeiro TR, Mendonça DN, de Carvalho CB, Monteiro AJ, Toyama DO, Toyama MH, Fonteles MC. Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. Arch Oral Biol. 2009 Jan;54(1):80-5.

Franco e Franco TC, Amoroso P, Marin JM, de Avila FA. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. Braz Dent J. 2007;18(4):329-33.

Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima N. Caries prevalence and salivary mutans strreptococci in 0-2-year-old children of Japan. Community Dent Oral Epidemiol 1991; 19:151-4.

Gibbons, RJ, Cohen I, Hay DI: Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to differentpellicle receptors. Infect Imun 1986;52:555-561.

Glass RL. The first international conference on the declining prevalence of dental caries. J Dent Res. 1982;61:1301–83.

Glass RT, Carson RS, Barker RL, Peiper SC, Shapiro S. Detection of HIV proviral DNA on toothbrushes: A preliminary study. J Am Dent Assoc 1994;84:17-20.

Glass RT, Jensen HG. More on the contaminated toothbrushes: The viral story. Quintessence Int 1988;19:713-6.

Globo.com. Mais simples, mais importante. Disponível em: http:/fantastico.globo.com/fantastico. Acesso em: 30 jan. 2003.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1973 Nov;18(11):1357-64.

Guedes-Pinto AC, Santos EM, Kwon HS. Higiene bucodental em Odontopediatria. In: Guedes-Pinto AC. Odontopediatria. 2ª ed. São Paulo: Ed. Santos; 2003. p.492-509.

Guo LH, Shi JN, Zhang Y, Liu XD, Duan J, Wei S. Identification of genetic differences between two clinical isolates of *Streptococcus mutans* by suppression subtractive hybridization. Oral Microbiol Immunol. 2006 Dec;21(6):372-80.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44:331-84.

Hames-Kocabas EE, Uçar F, Kocatas Ersin N, Uzel A, Alpöz AR. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. Microbiol Res. 2008;163(2):168-72.

Hildebrandt GH, Bretz WA. Comparison of culture media and chairside assays for enumerating mutans streptococci. J Appl Microbiol. 2006 Jun;100(6):1339-47.

Hirasawa M, Takada K. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to cell wall inhibitors and development of a novel selective medium for *S. sobrinus*. Caries Res. 2002:36(3):155-60.

Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. Caries Res. 2003;37:212–7.

Hofling JF, Spolidorio DM, Rosa EA, Pereira CV, Moreira D. Salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli in children ageing 6-8 year old having a socioeconomic background in Brazil. Indian J Dent Res. 1998 Jul-Sep;9(3):91-7.

Höfling JF, Spolidorio DMP, Pereira CV, Rosa EAR, Moreira D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev Odontol Univ São Paulo 1999;13:173-80.

Horiuchi M, Washio J, Mayanagi H, Takahashi N. Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: a possible ecological determinant in dental plaque. Oral Microbiol Immunol. 2009 Aug;24(4):319-24.

Huis in't Veld JHJ, Drost JS, Havenaar R. Establishment and localization of mixtures of *Streptococcus mutans* seotypes in the oral cavity of the rat. J Dent Res. 1982;61:1199-205.

Ikeda T, Sandham HJ. A medium for the recognition and enumeration of Streptococcus mutans. Arch Oral Biol. 1972 Mar;17(3):601-4.

Ito IY, Albuquerque Júnior RF, Alonso Verri R. Estreptococos: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral 1993, *Anais...* Ribeirão Preto: USP, 1993. p. 5.

Kennedy HF, Morrison D, Tomlinson D, Gibson BES, Bagg J, Gemmell CG. Gingivitis and toothbrushes: Potential roles in viridans streptococcal bacteremia. J Infect 2003;46:67-70.

Klock B, Krasse B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. Scand. J. Dent. Res. 1979;87: 129–139.

Köhler B, Andreen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol Immunol 1988;3:14-7.

Köhler B, Bjarnason S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. Community Dent Oral Epidemiol. 1987;15:332-5.

Köhler B, Bratthall D. Intrafamilial levels of mutans and some aspects of the bacterial transmission. J Dent Res 1978; 86:35-42.

Köhler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. Journal of Clinical Microbiology 1979;9:584-8.

Köhler B,. Pettersson B, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. Scand. J. Dent. Res. 1981;89: 19–25.

Kozai K, Iwai T, Miura K. Residual contamination of toothbrushes by micro-organisms. J Dent Child 1989;56:201-4.

Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2007 Jun;131(6):705.e11-7. Erratum in: Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2007 Dec;132(6):727.

Liljemark WF, Okrent DH, Bloomquist CG. Differential recovery of *Streptococcus mutans* from various mitis-salivarius agar preparations. J Clin Microbiol. 1976;4:108-9.

Lindquist B, Emilson CG. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. Caries Res 2004;38:95-103.

Lindquist B, Emilson CG. Dental location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in humans harboring both species. Caries Res 1991;25: 146–152.

Little WA, Korts DC, Thomson LA, Bowen WH. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on ten isolation media. J Clin Microbiol. 1977;5:578–83.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50:353–380.

Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MPA. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol 2003;18:144-9.

Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by Streptococcus mutans in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008 Apr;133(4 Suppl):S104-9.

Malmberg E, Birkhed D, Norvenious G, Norén JG, Dahén G. Micro-organisms on toothbrushes at daycare centers. Acta Odontol Scand 1994;52:93-8.

Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. Compend Contin Educ Dent. 2009 Mar;30(2):76-8.

Mattos-Graner RO, Li Y, Caufield PW, Duncan M, Smith DJ. Genotypic diversity of mutans streptococci in brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39(6):2313-6.

McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 2003;221:25-30.

Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity. Arch Oral Biol. 2005 Mar;50(3):341-5.

Muller HP, Lange DE, Muller RF. Actinobacillus actinomicetemcomitans contamination of toothbrushes from patients harboring the organism. J Clin Periodontol 1998;16:388-90.

Munro C, Michalek SM, Macrina FL. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. Infect Immun 1991;59:2316-23.

Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype K, in the human oral cavity. J Clin Microbiol 2004 Jan.; 42(1):198-202.

Nelson-Filho P, Baptistussi M, Azevedo RVP, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em saliva de escolares de 5 a 14 anos de idade, na cidade de Sertãozinho, Estado de São Paulo. Rev FOB 1996 Jan/Jun;4(1/2):83-7.

Nelson-Filho P, Isper AR, Assed S, Faria G, Ito IY. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. Pediatr Dent 2004;26:11-6.

Nelson-Filho P, Faria G, da Silva RA, Rossi MA, Ito IY. Evaluation of the contamination and disinfection methods of toothbrushes used by 24- to 48-month-old children. J Dent Child. 2006 Sep-Dec;73(3):152-8.

Nelson-Filho P, Louvain M, Silva RAB, Silva LAB, Ito IY. Pacifiers: evaluation of the microbial contamination and efficacy of disinfection methods. Pediatrics, 2009 (submitted).

Nelson-Filho P, Macari S, Faria G, Assed S, Ito IY. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. Pediatr Dent 2000;22:381-4.

Newbrun E. Preventing dental caries: breaking the chain of transmission. Am Dent Assoc J 1992;123:55-9.

Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000;15:258-262.

Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, Kozai K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol 2002 Dec.;51: 443-7.

Peixoto ITA, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: a randomized clinical investigation. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2009 (in press).

Pimenta FC, Marin JM, de Uzeda M, Ito IY. Prevalence of mutans streptococci in 93 members from six Brazilian families. Pesqui Odontol Bras. 2001 Jul-Sep;15(3):181-6.

Pinto EDR, Paiva EMM, Pimenta FC. Viabilidade de microrganismos anaeróbios da cavidade bucal em escovas dentárias. Periodontia 1997;6:8-12.

Pitts NB. Risk assessment and caries prediction. J Dent Educ. 1998;62:762–70.

Poggio C, Arciola CR, Rosti F, Scribante A, Saino E, Visai L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to different restorative materials. Int J Artif Organs. 2009 Oct 31;32(9):671-677.

Quirynen M, De Soute M, Pauwels M, Gizani S, Van Meerbeeck B, Van Steenberghe D. Can toothpaste or a toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? J Periodontol 2003;74:312-22.

Rodis OM, Matsumura S, Kariya N, Okazaki Y, Ogata S, Reissmann DR.Culture-based PCR analysis of plaque samples of Japanese school children to assess the presence of six common cariogenic bacteria and its association with caries risk. Mol Cell Probes. 2009 Dec;23(6):259-63.

Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. *Streptococcus sobrinus* in children and its influence on caries activity. Eur Arch Paediatr Dent. 2006 Mar;7(1):17-22.

Saito K, Hayakawa T, Kawabata R, Meguro D, Kasai K. In vitro antibacterial and cytotoxicity assessments of an orthodontic bonding agent containing benzalkonium chloride. Angle Orthod. 2009;79(2):331-7.

Sato S, Pedrazzi V, Guimarães Lara EH, Panzeri H, Ferreira de Albuquerque R Jr, Ito IY. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an in vivo evaluation. Quintessence Int. 2005 Nov-Dec;36(10):812-6.

Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Franken HCM. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium, *J Dent Res.* 1986;65:906–8.

Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun 1992;60:284-95.

Sconyers JR, Crawford JJ, Moriarty JD. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. J Am Dent Assoc 1973;87:616-22.

Seki M, Karakama F, Ozaki T, Yamashita Y. An improved method for detecting mutans streptococci using a commercial kit. J Oral Sci 2002;44:135-9.

Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. Oral Microbiol Immunol. 2006 Feb;21(1):47-52.

Seow WK, Clifford H, Battistutta D, Morawska A, Holcombe T. Case-control study of early childhood caries in Australia. Caries Res. 2009;43(1):25-35.

Seppä L, Pöllänen L, Hausen H. *Streptococcus mutans* counts obtained by a dip-slide method in relation to caries frequency, sucrose intake and flow rate of saliva. Caries Res 1988; 22:226-9.

Shklair IL, Keene HJ.A biomechanical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans* . Arch Oral Biol 1974;19:1079-81.

Silveira E. Meio século de história. Publicação de primeiro artigo sobre DNA completa 50 anos. Jornal UNESP 2003 abr n°176.

Simark-Mattsson C, Jonsson R, Emilson CG, Roos K. Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral Lactobacillus strains against mutans streptococci. Arch Oral Biol. 2009 Jun;54(6):602-7.

Spolidorio DM, Goto E, Negrini TC, Spolidorio LC. Viability of *Streptococcus mutans* on transparent and opaque toothbrushes. J Dent Hyg. 2003 Spring;77(2):114-7.

Staat RH. Inhibition of *Streptococcus mutans* strains by different mitis-salivarius agar preparations. J Clin Microbiol. 1976;3:378–80.

Steers E, Foltz EL, Graves BS, Suriano HJ. Comparison of bacterial susceptibility to antibiotics as determined by the plate dilution method and by the disc method. Antibiot Annu. 1959-1960;7:604-13.

Suido H, Offenbacher S, Arnold RR. A clinical study of bacterial contamination of chlorhexidinecoated fi laments of an interdental brush. J Clin Dent 1998;9:105-9.

Sullivan A, Wretlind B, Nord E. Will triclosan in toothpaste select for resistant oral streptococci? Clin Microbiol Infect 2003;9:306-9.

Svanberg M, Krasse B. Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media. Caries Res 1990;24:36-38.

Svanberg M. Contamination of toothpaste and toothbrushes by *Streptococcus mutans*. Scand J Dent Res 1978;86:412-4.

Syed SA, WJ Loesche. Survival of human dental plaque flora in various transport media. 1972;24:638-644.

Syed SA, Loesche WJ. Efficiency of various growth media in recovering oral bacterial flora from human dental plaque. Appl Microbiol 1973;26:459-65.

Takada K, Hirasawa M. A novel selective medium for isolation of *Streptococcus mutans*. J Microbiol Methods. 2005 Feb;60(2):189-93.

Takahashi N, Nyvad B. Caries Res. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. 2008;42(6):409-18.

Tankkunnasombut S, Youcharoen K, Wisuttisak W, Vichayanrat S, Tiranathanagul S. Early colonization of mutans streptococci in 2- to 36-month-old Thai children. Pediatr Dent. 2009 Jan-Feb;31(1):47-51.

Tedjosasongko U, Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. J Dent Child 2002;69:284-8.

Torres AS, Pizzolitto AC, Ellias AM, Ito IY. Estreptococos do grupo mutans: avaliação do ágar SB-20 e MSB na determinação de ufc na saliva e na placa dental de adolescentes. Rev Bras Odontol 1993;50:18-21.

Truper HG, De Clari L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) ‘‘in apposition’’. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:908–9.

van Loveren C, Buijs JF, Ten Cate JM. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquire the strains after the age of 5. Caries Res 2000;34:481-5.

van Palenstein Helderman WH. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. Arch Oral Biol. 1983;28(7):599-603.

Verran J, Leahy-Gilmartin A, Watson GK, Hammond K, Huntington E, Raven SJ. Microbial contamination of toothbrushes during an in-home trial. J Dent Res 1997;76(special issue):437.

Wade WG, Aldred MJ, Walker DM. An improved medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol*. 1986;22(4):319-23.

Wan AKL, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. J Dent Res 2003;82:504-8.

Warren DP, Goldschimidt MC, Thompson MB, Adler-Storthz K, Keene WJ. The effects of toothpastes on the residual microbial contamination of toothbrushes. J Am Dent Assoc 2001;132:1241-5.

Watanabe E, Tanomaru JM, Nascimento AP, Matoba-Júnior F, Tanomaru-Filho M, Yoko Ito I. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. J Appl Oral Sci. 2008 Jul-Aug;16(4):275-9.

Weinberger SJ, Wright GZ. Correlating *Streptococcus mutans* with dental caries in young children using clinically applicable microbiological method. Caries Res 1989; 23:385-8.

Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. J Clin Microbiol. 1978 Jan;7(1):82-3.

Wetzel WE, Schaumburg C, Ansari F, Kroeger T,Sziegoleit A. Microbial contamination of toothbrushes with different principles of fi lament anchoring. J Am Dent Assoc 2005;136:758-65.

Whatmore AM, Whiley RA. Re-evaluation of the taxonomic position of *Streptococcus ferus*. Int J Syst Evol Microbiol 2002:52, 1783–1787.

Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. Oral Microbiol Immunol 1998 Mar.; 13:195-216.

Whiley RA, Russell RRB, Hardie JM, Beighton D. *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans* serotype h. Int J Syst Bacteriol. 1988; 38: 25-29.

White BA, Caplan DJ, Weintraub JA. A quarter century of changes in oral health in the United States. J Dent Educ. 1995;59:19–57.

Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J* Gen Microbiol. 1964;35:13-26.

Winter GB. Epidemiology of dental caries. Arch Oral Biol. 1990;35 Suppl:1S-7S.

Zarski JP, Leroy V. Counseling patients with hepatitis C. J Hepatol 1999;31:136-40.

APÊNDICE A- Trabalhos resultantes desta tese até o presente momento.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Silva RAB, Faria G, Rossi MA, Ito IY. Viability of *Streptococcus mutans* toothbrush bristles. J Dent Child. 2008 Jan-Apr;75(1):29-32.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Ito IY, Silva LAB, Silva RAB, Emilson CG. Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. Microbiological Research, 2010 (in press).

Silva LAB, Nelson-Filho P, Saravia ME, Silva RAB, Ito IY. Mutans streptococci remained viable on toothbrushe´s bristles, *in vivo*, for 44 hours. Trabalho enviado para o Journal of American Dental Association, em 2009.

Ito IY, Nelson-Filho P, Saravia ME, Emilson CG, Faria G, Silva LAB. Avaliação comparativa da eficácia dos meios de cultura SB-20M e MSB na identificação morfológica e bioquímica de *S. mutans* e de *S. sobrinus*. Trabalho em fase de versão para a língua inglesa.