

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Cerise de Castro Campos

***Estreptococos do grupo mutans: transmissão vertical entre
crianças com Síndrome de Down e suas mães.***

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo
Universidade de Brasília
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta
Universidade Federal de Goiás
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Brasília - DF
2006

Cerise de Castro Campos

***Estreptococos do grupo mutans: transmissão vertical entre
crianças com Síndrome de Down e suas mães.***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - UnB, para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo
Universidade de Brasília
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Fabiana Cristina Pimenta
Universidade Federal de Goiás
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

**Brasília - DF
2006**

**"Descobri que ao conhecer alguém
com deficiência não se deve perguntar:
'O que posso fazer por ele?','
mas estar aberto ao que ele pode ensinar."**

Walcyr Carrasco

Agradecimentos

À Deus, porque tudo deve ser feito para sua Glória.

A minha mãe Mamie de Castro Oliveira pela certeza de todas as coisas e à minha irmã Raquel de Castro Campos Jayme Consorte pelo apoio na defesa da tese.

Ao Fabrício Fiaccadori, amor incondicional para sempre, presença inestimável em todos os momentos, diferencial na minha vida.

Aos pacientes com Síndrome de Down, meu respeito e dedicação.

Aos pais de pacientes especiais minha admiração.

Ao Professor Doutor Orlando Ayrton de Toledo pelo exemplo de homem da ciência, ser humano maravilhoso e além de um mestre, um pai. Obrigada pela confiança e pelos ensinamentos.

A Professora Doutora Fabiana Cristina Pimenta cuja presença é imprescindível.

A Professora Doutora Ana Cristina Bezerra pela acolhida carinhosa, ensinamentos e amizade.

A minha amiga-irmã Ana Beatriz Feijó Rocha Lima, seu marido Leandro Drumond Marques e filhos Renato Rocha Lima Marques e Ivo Rocha Lima Marques e a Maria Valdenice Barbosa de Almeida (Val) porque fizeram da sua casa em Brasília, a minha.

Aos queridos amigos Lilian de Fátima Guedes de Amorim e seu esposo Robson de Freitas Mendonça, por terem estado comigo nesta travessia.

A querida colega de Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília Lúcia de Deus Moura pelo agradável convívio.

Ao Professor Evandro Ribeiro Leão, sempre um anjo em minha vida.

A colega cirurgiã-dentista Cristina dos Santos Resende cuja colaboração na clínica dos pacientes com Síndrome de Down foi fundamental.

Aos acadêmicos e estagiários do Projeto de Extensão GEPETO (Grupo de Estudo sobre Pacientes Especiais e Tratamento Odontológico) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás pelo apoio técnico em especial: Alessandra Carvalho de Souza, Ana Paula de Souza Costa, Fabiana de Queiroz Correa e Juliana Moreira de Oliveira.

Ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás pela disponibilidade e realização da parte técnica.

Aos Professores Doutores Ana Cristina Bezerra, Aida Sabbagh Haddad, Carlos Estrela, Soraya Coelho Leal, pela disponibilidade, atenção e precisão no exame, correção e sugestões na finalização desta tese: muito obrigada.

A tia Eulélia (Célia) Antônio Barros pela paciência e carinho na finalização gráfica desta tese.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus filhos Marcelo Campos Pires e Murilo Campos Pires e à minha sobrinha Lara Campos Jaime Consorte: o conhecimento sem discernimento e sabedoria é inócuo e fugaz.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a colonização e a transmissão vertical de EGM em 16 pares mãe e filho com Síndrome de Down (SD) com idade até 12 anos. Os isolados característicos destes microrganismos foram identificados fenotipicamente e as colônias analisadas através de bacteriocinotipagem. Três pares mãe-filho albergavam EGM com o mesmo perfil de produção de bacteriocinas (Pares 1, 6 e 14). O DNA cromossomal foi digerido com enzima Hae III e analisado (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis* - RFLP) em gel de agarose pela eletroforese. Os resultados mostraram que nos três pares que compartilhavam o mesmo bacteriocinotipo de *Streptococcus mutans*, um par tinha os genótipos idênticos (Par 6) e em outro, similares (Par 14). Não foi possível extração de DNA do isolado da criança do Par 1.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the distribution of mutans streptococci and vertical transmission in some families with a child with Down Syndrome (DS). Isolates of mutans streptococci was performed in 16 mother-infant pairs. After growth, representative colonies were compared using bacteriocin typing and chromosomal DNA by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP). The DNA was digested with restriction enzyme *Hae* III, electrophoresed on agarose gels and the resulting patterns were compared. Analysis showed that in 3 families the mothers shared same bacteriocinotypes with their children; one harbored identical genotypes (Pair 6) and the other, similar genotypes (Pair 14).

LISTA DE ABREVIATURAS e SÍMBOLOS

- negativo

+ positivo

± mais ou menos

= menor ou igual

= maior ou igual

μ micra

= igual

♂ masculino

♀ feminino

% por cento (porcentagem)

x sinal de multiplicação

BHI *Brain Hearth Infusion* (infusão de cérebro e coração).

ceo Dentes decíduos cariados, com extração indicada ou obturados

ceos Superfícies de dentes decíduos contabilizadas no índice de cariados, com extração indicada ou obturados

cm Centímetros.

CPOD Dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados

CPOS Superfícies contabilizadas no índice de dentes cariados, com extração indicada ou obturados

DNA ácido desoxiribonucléico

DNA *fingerprint* "Impressão digital" do DNA

EGM Estreptococos grupo mutans

eppendorf microtúbulos com tampas usados para armazenamento de material em laboratório

g Gramas

GEPETO Grupo de Estudos em Pacientes Especiais e Tratamento Odontológico

GTF glicosiltransferase

IgM imunoglobulina M

L Litro

min Minuto

mL Mililitro

MLEE Sigla em inglês de eletroforese de isoenzimas (*Multilocus Enzyme Eletroforesis*)

mol/ mL mol por mililitro

mM Milimolar.

MSB *Ágar mitis salivarius* acrescido de bacitracina.

n Número.

°C Grau Celsius.

OMS Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

PCR Sigla em inglês de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*).

PFGE Sigla em inglês de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

pH Potencial hidrogeniônico.

Primers Oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hibridização com a cadeia molde à qual é complementar

OCSS Sigla em inglês de índice de severidade de cárie (*Original Carie Severity Score*)

RFLP Sigla em inglês de técnica de determinação do perfil de DNA por restrição enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis*)

SD - Síndrome de Down

Southern blotting - sigla em inglês de exame para identificação genotípica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Fotografia do gel com o perfil de DNA de *Streptococcus mutans* de pares mãe-filho com Síndrome de Down (Pares 1, 6 e 14)..... Pag. 52

Tabela 1. Sistema de determinação da produção de bacteriocinas contra três cepas indicadoras.....Pag. 45

Tabela 2. Distribuição dos 16 pares mãe-filho com Síndrome de Down de acordo com a idade, contagem de colônias de EGM (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), bacteriocinotipagem dos isolados, prevalência de cárie (ceo e CPOD) e gênero das crianças.....Pag. 50

Tabela 3. Distribuição das 16 crianças com Síndrome de Down com a faixa etária e colonização de esteptococos do grupo mutans.....Pag. 51

Tabela 4. Distribuição das mães esteptococos do grupo mutans negativo e nível de esteptococos do grupo mutans das crianças com Síndrome de Down de acordo com a idade.....Pag. 53

Tabela 5. Distribuição das crianças Síndrome de Down esteptococos do grupo mutans negativo e nível de *Streptococcus mutans* das mães..... Pag. 53

Tabela 6 . Distribuição das 16 crianças com síndrome de Down e suas mães de acordo com o nível de esteptococos do grupo mutans..... Pag. 54

Tabela 7. Distribuição das mães e crianças com Síndrome de Down de acordo com nível de esteptococos do grupo mutans e risco de cárie..... Pag. 55

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
2. Revisão de Literatura.....	6
2.1. Estreptococos do grupo mutans.....	6
2.1.1. Colonização de estreptococos do grupo mutans e cárie.....	9
2.2. Síndrome de Down.....	16
2.2.1. Síndrome de Down, estreptococos do grupo mutans e cárie.....	17
2.3. Transmissão intrafamiliar de estreptococos do grupo mutans.....	24
3. Objetivo.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. Metodologia.....	42
4.1. Coleta, isolamento e identificação dos estreptococos do grupo mutans	42
4.2. Bacteriocinotipagem.....	44
4.3. Determinação do perfil de restrição enzimática: caracterização genotípica do <i>Streptococcus mutans</i>	45
4.3.1. Extração do DNA total.....	45
4.3.2. Digestão do DNA total.....	46
4.3.3. Determinação do perfil de restrição enzimática.....	47
4.4. Determinação do índice de prevalência de cárie.....	47
5. Resultados.....	48
6. Discussão.....	56
7. Conclusões.....	67
Referências Bibliográficas	68
Anexos.....	88
Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética e Consentimento informado e esclarecido.....	89
Anexo 2 - Meios de cultura, soluções e reagentes.....	98

1. Introdução

A cárie é uma doença bacteriana mediada por múltiplos fatores cuja interação em condições críticas e por um determinado período de tempo provoca inicialmente o aparecimento de lesões no esmalte dentário que evolui até a destruição total do dente (Zero, 1999).

Dentre os microrganismos cariogênicos os estreptococos do grupo mutans (EGM), mais especificamente os *Streptococcus mutans*, possuem papel relevante, pois são os iniciadores da cárie, sendo transmitidos de uma pessoa para outra através da saliva (Loesche, 1986).

Tudo indica que a fonte primária de transmissão de *Streptococcus mutans* para as crianças é a mãe através do contato íntimo e freqüente nos primeiros anos de vida (Long et al., 1993; Slavkin, 1997; de Soet et al., 1998; Pimenta et al., 2001_a). Diversos estudos demonstraram que as cepas isoladas das crianças são idênticas aquelas encontradas na saliva de suas progenitoras (Berkowitz et al., 1975; Caufield et al., 1982; Berkowitz & Jones, 1985; Caufield, 1985).

A contagem de unidades formadoras de colônia (ufc) de EGM por mililitros (mL) de saliva da mãe é determinante na colonização das crianças por estes microrganismos. Quando os níveis salivares de EGM da mãe são superiores a 10^5 ufc/mL (unidades formadoras de colônia por mililitros), as crianças são colonizadas com maior freqüência do que em mães que tem menores níveis. O desenvolvimento das lesões cariosas é dependente do momento em que ocorreu a infecção e a precoce colonização está geralmente associada com maior prevalência de cárie dentária (Berkowitz et al., 1981; Alaluusa & Renkonen, 1983; Köhler et al., 1988; Caufield et al., 1993; Straetemans et al., 1998).

O período de maior probabilidade de aquisição inicial de EGM que ocorre entre 19 – 31 meses de idade (época de irrupção dos dentes decíduos), foi denominado por Caufield (1993) de “Janela de Infectividade”. Nesta época a necessidade de implementar-se a prevenção da colonização milionária de EGM é muito importante, visto que crianças com experiência precoce de cárie dentária, tem maior susceptibilidade de adquiri-la na idade adulta (Köhler & Jonsson, 1984; Fujiwara et al., 1993; Karn et al., 1998). A partir da colonização é muito difícil obter redução considerável na contagem destes microrganismos, a não ser que intervenções odontológicas sejam levadas a efeito (Höfling, 1992).

Isto é particularmente importante quando condições adversas de vida estão presentes como na Síndrome de Down (SD). Características físicas e mentais, dieta oferecida, maior número de agenesias e retardo de irrupção dental, possíveis diferenças de colonização da microbiota bucal, dificuldade de higienização (pelos problemas de coordenação motora próprios da síndrome) podem interferir na sua susceptibilidade a cárie (Campos, 2001). Segundo Crespo (1987) o plano de tratamento deve ser ajustado de acordo com as necessidades dos pacientes com Síndrome de Down, enfatizando a implementação de medidas preventivas desde a mais tenra idade.

A contagem de EGM na saliva e/ou biofilme dentário é um dos critérios que podem ser usados para determinação do risco de cárie de indivíduos ou de uma população porque amostras de saliva refletem o número de superfícies dentais colonizadas (van Houte & Green, 1974; Bratthall et al., 1996). Azevedo et al., 1998 ressaltaram que a análise qualitativa e quantitativa de EGM em nível de espécie pode servir como parâmetro para selecionar métodos de prevenção de cárie dentária.

As crianças com maiores níveis de colonização por *Streptococcus mutans* apresentam maior risco e prevalência de cárie (Zickert et al., 1983; Höfling, 1992; Azevedo et al., 1993; Thibodeau & O’Sullivan, 1996). No entanto a doença pode desenvolver-se em indivíduos com níveis não detectáveis de EGM

(Loesche & Strafon, 1979) e pacientes cárie-inativos são também colonizados por estes microrganismos (Nyvad & Killian, 1990).

A detecção ou não de EGM não pode ser tomada como determinante da atividade cariogênica, mas identificar pacientes suscetíveis ao desequilíbrio do processo de des-remineralização ajuda no planejamento e execução de programas preventivos (Buischi et al., 1987; Powell, 1998; Tanzer, 1999). Em pacientes com múltiplas necessidades médicas, educacionais e de integração como os com SD, uma melhor qualidade de vida pode ser viabilizada com a determinação de prioridades no que diz respeito à promoção de saúde.

Analisando a colonização e os níveis de EGM é possível estimar o risco de cárie em crianças com SD, respeitando a individualidade do paciente e considerando os outros fatores que estão envolvidos na patogênese da doença.

A evidência da transmissão de EGM é baseada no isolamento de cepas similares dos indivíduos de uma mesma família, particularmente nos pares mãe-filho. A taxa de transmissão seria dependente do número de EGM e frequência de contato com a criança, bem como dieta e atividade imunológica (Caufield, 1997). O controle da cadeia de transmissão microbiana pela diminuição das unidades formadoras de colônias da microbiota cariepatogênica pode protelar ao máximo a colonização de EGM em novos hospedeiros (Hamada & Slade, 1980).

O aprimoramento dos métodos de tipagem microbiana empregando as técnicas de biologia molecular, permite uma caracterização acurada dos isolados, uma vez que se baseia nas informações genóticas, as quais são menos variáveis que as fenóticas (Wolcott, 1991). Esses progressos na genética microbiana resultaram em técnicas rápidas, sensíveis e específicas, que permitem uma tipagem e determinação da similaridade/identidade das cepas (Pfaller & Herwaldt, 1997).

Avanços nas ciências da saúde (técnicas diagnósticas e tratamentos), aumento da expectativa de vida, aceitação inclusiva da sociedade e desinstitucionalização de pessoas com Síndrome de Down faz com que o número delas seja expressivo na comunidade levando a um aumento da procura de serviços odontológicos.

Como a interação parasita-hospedeiro é um fator determinante no desenvolvimento da cárie, o patrimônio biológico do indivíduo deve ser considerado na análise da sua patogênese. A questão que se faz é se a colonização de EGM seria diferente em pacientes com SD. Por este motivo este estudo objetivou pesquisar a transmissão intrafamiliar destes microrganismos entre pares de mãe-filho com Síndrome de Down oferecendo subsídios para o entendimento do ecossistema bucal em pacientes trissômicos do 21.

2. Revisão de Literatura

2.1. Estreptococos do grupo mutans.

Os estreptococos bucais são denominados de estreptococos viridans, incluindo quatro grupos: os anginosos, mitis, mutans e salivarius. A classificação é baseada na taxonomia e dados genotípicos. Os estreptococos do grupo mutans (EGM) têm oito espécies e oito sorotipos: *Streptococcus cricetus* (a), *Streptococcus rattus* (b), *Streptococcus mutans* (c,e,f), *Streptococcus ferus* (c), *Streptococcus macacae* (c), *Streptococcus sobrinus* (d,g), *Streptococcus downei* (h) e *Streptococcus onisratti*, sendo que os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são predominantes entre as populações humanas (Loesche, 1986; Whiley & Beighton, 1998; Zhu et al., 2000).

Os *Streptococcus mutans* foram descritos por Clark (1924), como cocos imóveis, anaeróbios facultativos, catalase negativos de forma oval com 0,5 - 2,0 µm de diâmetro em pares ou em cadeia, presentes na dentina de cárie profunda. Estes estreptococos são Gram-positivos, fermentam preferencialmente carboidratos produzindo lactato (Hardie, 1986). No entanto, a relação destes microrganismos com a cárie dentária só pôde ser comprovada anos depois com as pesquisas em animais gnobióticos (Fitzgerald & Keyes, 1960; Hamada & Slade, 1980).

A colonização de EGM ocorre na presença de superfícies não descamativas na cavidade bucal de recém-nascidos (Berkowitz et al, 1975; Pereira, 2002). A colonização de EGM depende do tamanho e frequência do inóculo bacteriano, aderência às superfícies dentais e variáveis do hospedeiro (Korenstein et al., 1995). A produção de bacteriocinas, chamadas de mutacinas quando são produzidas por *Streptococcus mutans*, interferem no desenvolvimento de outras bactérias por antagonismo seletivo, tendo um importante papel na colonização de uma determinada cepa pioneira (Grönroos et al., 1998).

A síntese de polissacarídeos intra e extracelulares, produção de ácidos e aciduridade, aderência de *Streptococcus mutans* na superfície dentária e sua agregação intercelular são facilitadas por glucanas insolúveis produzidas por estes microrganismos (Hamada & Slade, 1980; de Soet et al., 1989; Li & Caufield, 1995). Os *Streptococcus mutans* secretam três tipos de glicosiltransferase (GTF-1, GTF-SI, GTF-S). O GTF-1 participa na síntese de glucano insolúvel a partir sacarose e pode ser usada para a identificação de diferentes cepas através da pesquisa do gene *gtfB* que codifica esta enzima (OHO et al., 2000; OKADA et al., 2002).

Nör, 1998 relatou que o emprego de técnicas de biologia molecular permite uma melhor compreensão do envolvimento dos EGM no processo cariogênico. Caufield & Walker, 1989 destacaram a determinação do perfil de DNA pela restrição enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorphism analysis* - RFLP) como um método seguro para pesquisa e análise do DNA cromossomal de *Streptococcus mutans*. Tudor et al., 1990 afirmaram em seus estudos com o DNA de *Streptococcus mutans*, que a eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE) é um método acurado para caracterizar o genoma bacteriano. A ribotipagem permite estabelecer a complexidade das populações de *Streptococcus mutans* em uma única boca, como também o fato deles permanecem estáveis por vários anos. Okada et al., 2002 e Yano et al., 2002 observaram que a quantificação de *Streptococcus mutans* pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) pode ser usada para avaliar o envolvimento destes microrganismos nos processos cariogênicos, pois são métodos precisos e confiáveis. O número de cópias do DNA por unidades formadoras de colônia (ufc) é influenciado pelas características de diferentes espécies (como o resistente envelope das bactérias Gram-positivas), diversidade de cepas e condições de armazenamento das amostras. O PCR pode detectar DNA de microrganismos vivos ou não, facilitando a quantificação e identificação de *Streptococcus mutans* mesmo em condições adversas de estocagem, mostrando um desempenho satisfatório quando comparado a ensaios padrões de identificação de culturas microbianas. Rosa et al., 2005 constataram que o uso de eletroforese de isoenzimas (*Multilocus*

enzyme electrophoresis - MLEE) fornece perfis de bandas que permitem a caracterização em nível intraespecífico, mostrando-se uma técnica robusta que pode ser usada para estudos da diversidade clonal de cepas clínicas de *Streptococcus mutans* em levantamentos epidemiológicos.

2.1.1. Colonização de *Streptococos* do grupo mutans e cárie.

A colonização por microrganismos da cavidade bucal em humanos inicia-se ao nascimento e o ecossistema bucal encontra-se em constante desenvolvimento, estando sujeito a mudanças ao longo da vida do indivíduo. A colonização da cavidade bucal da criança é dependente da erupção dos dentes decíduos (Li & Caufield, 1995), da magnitude e frequência de inoculação (Aaltonen & Tenovuo, 1994), dos níveis salivares maternos (Köhler & Bratthall, 1978; Berkowitz et al., 1980; Berkowitz et al., 1981; Köhler & Andréen, 1994; Berkowitz, 1996; Wan et al., 2003) e do estado imunológico da criança, além do padrão de consumo de sacarose pela criança (Köhler & Bratthall, 1978; Caufield et al., 1993; Mattos-Graner et al., 1998).

Foi realizada a contagem de *Streptococcus mutans* e lactobacilos na saliva de 655 crianças suecas de nove a 12 anos de idade. Detectaram EGM em 92,4% das crianças e lactobacilos em 79,0%. A prevalência foi elevada e 80% das crianças tinham 10^5 ufc/mL ou mais colônias de *Streptococcus mutans* e $10,3 \times 10^6$ ufc/mL de lactobacilos. O *Streptococcus mutans* apresentou correlação positiva com cárie incipiente de superfície lisa, todas as demais lesões cavitadas e dentes obturados. Não houve correlação entre lactobacilos e cárie incipiente de superfície lisa, mas houve correlação positiva entre estes microrganismos e as lesões cavitadas e dentes obturados (Klock & Krasse, 1977).

Em amostras de biofilme de molares decíduos e permanentes, de 52 crianças americanas (cinco a 12 anos de idade), investigou-se os níveis de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e lactobacilos antes e depois do desenvolvimento de cárie de fissuras oclusais. Foram realizados quatro exames com seis meses de intervalo e os resultados demonstraram que o *Streptococcus mutans* estavam associado à mesma. No entanto, considerou-se que a doença pode desenvolver-se em indivíduos com níveis não detectáveis de EGM (Loesche & Straffon, 1979).

Identificar e monitorar, durante três anos, a proporção de *Streptococcus mutans*, lactobacilos, *Streptococcus sanguis*, *Veillonella* e *Actinomyces* no biofilme de fissuras oclusais de molares foram os objetivos de Loesche et al., 1984 em estudo com 368 crianças americanas de sete e oito anos de idade. As crianças com grande número de dentes cariados apresentavam maior contagem de *Streptococcus mutans* do que as crianças livres de cárie. Os outros microrganismos não puderam ser associados com o desenvolvimento de cárie.

Com o objetivo de determinar a correlação de *Streptococcus mutans* e prevalência de cárie, foram analisados 222 escolares de São Paulo de 12 e 13 anos. Não foram encontrados *Streptococcus mutans* em 16 adolescentes (7,2%), embora tivessem lesões, sendo que a prevalência de cárie foi significativamente maior nos portadores de alta contagem de colônias (EGM = 100ufc/mL). No entanto, a detecção ou não de *Streptococcus mutans* não pode ser tomada como único determinante da atividade cariogênica (Buischi et al., 1987).

O nível de *Streptococcus mutans* na saliva e no biofilme dentário foi avaliado em 149 crianças de cinco anos de idade. De acordo com o número de bactérias foram estabelecidos níveis: baixo – 5×10^3 ufc/mL (19% das crianças com ceos = $1,0 \pm 1,6$); moderado – 5×10^4 ufc/mL (21% das crianças com ceos = $6,2 \pm 9,1$) e alto: $> 10^5$ ufc/mL (6% das crianças com ceos = $8,8 \pm 8,5$). Não foram detectados *Streptococcus mutans* em 54% das crianças cujo ceos era de $0,3 \pm 0,9$. Estes resultados mostraram associação entre o nível salivar de *Streptococcus mutans* e experiência de cárie (Alaluusa et al., 1989)

O exame microbiológico da saliva de 200 escolares de seis a nove anos de idade, da região de Piracicaba, São Paulo, foi feito para avaliar a frequência e valores de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* e seu significado em relação à atividade cariogênica. Sessenta e cinco por cento das crianças analisadas apresentou de 10^5 a 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans* na saliva. Höfling, 1992 considerou que a longa permanência de índices altos de EGM numa população, indica a persistência ou mesmo a progressão da incidência de cárie porque a mesma está associada a estes microrganismos.

Com o objetivo de determinar-se a contagem de EGM e a prevalência de suas espécies na saliva, foram estudadas 193 crianças entre três a 11 anos de idade em Ribeirão Preto, São Paulo. Os resultados obtidos foram classificados em três categorias de risco à cárie, de acordo como o nível salivar de EGM: 0 a 20ufc/mL (baixo); de 21 a 100ufc/mL (médio) e maiores que 100 ufc/mL (alto risco). Cinquenta e nove crianças (30%) apresentavam baixo risco; 58 (30%) – médio risco e 76 (39,4%) – alto risco. EGM foram detectados na saliva de 189 crianças (97,9%). Destas, 89 (47,1%) albergavam *Streptococcus mutans* e 100 (52,9%) *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Azevedo et al., 1993).

A ocorrência de EGM foi investigada na Tanzânia em 100 crianças de 1,0 a 3,5 anos com e sem cárie. A prevalência de cárie para estes grupos era de 12,8% e 1,6%, respectivamente. Todos EGM encontrados foram identificados como *Streptococcus mutans* (Matee et al., 1993).

A prevalência de *Streptococcus mutans* e sua colonização foram investigadas por Dasanayake et al., 1995 em 353 crianças afro-americanas de cinco a 12 anos de idade. Noventa e dois por cento das crianças tinham níveis detectáveis de EGM, sendo que 19% tinham 10^6 ufc/mL de saliva; 33% com 10^5 – 10^6 ufc/mL e 48% com 1 – 10^5 ufc/mL. As crianças que apresentavam maior número de colônias tinham maiores índices de cárie em ambas as dentições. Encontraram correlação positiva entre prevalência de EGM e cárie e, entre níveis de EGM na saliva e frequência de consumo de açúcar, mas não entre a porcentagem de dentes tratados e EGM.

Avaliando parâmetros clínicos, salivares e microbiológicos de 356 crianças brasileiras de seis a oito anos de idade durante dois anos, Gavazzi et al., 1995 encontraram índice de: ceos = 4,94 ; $2,24 \times 10^5$ ufc/mL de *Lactobacillus* e $9,67 \times 10^5$ ufc/mL de *Streptococcus mutans*. O incremento de cárie durante o período analisado tinha correlação positiva com EGM. Houve uma correlação positiva também, entre a experiência passada de cárie na dentição decídua (ceos) e o incremento de cárie em dentes permanentes (CPOS).

A associação entre níveis salivares de EGM, a prevalência, incidência e distribuição de cárie na dentição decídua foi analisada em 146 crianças americanas de 3,8 anos de idade média. Os resultados, após dois anos, mostraram que crianças com moderada ($1 - 50\text{ufc/mL}$) e alta ($> 50\text{ufc/mL}$) contagem de EGM, tinham duas vezes mais cárie que as de baixa contagem (Thibodeau & O' Sullivan, 1996).

Foi estudada a correlação de EGM e manchas brancas ativas nos dentes de uma amostra de 164 crianças brasileiras de seis a 12 anos que recebiam assistência odontológica semanal. Os indivíduos com altos índices de EGM ($2,5 \times 10^5 \text{ ufc/mL}$) apresentavam frequência significativamente maior de manchas brancas que aqueles com níveis não detectados ou baixos (Alves & Medeiros, 1997).

A colonização pelos EGM foi analisada em 149 crianças de oito a 15 meses de idade. Os resultados mostraram colonização em 14% das crianças aos 10 meses (até 50ufc/mL). Na idade de 15 meses, 60% estavam colonizadas e algumas tinham mais de 50ufc/mL . Karn et al., 1998 enfatizaram a necessidade de implementar-se a prevenção da colonização de EGM desde o nascimento .

Mattos-Graner et al., 1998 avaliaram a prevalência de EGM em 142 crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com a frequência e severidade da cárie dental. Ao exame clínico foram observadas lesões de manchas brancas e cavitações em todas as superfícies dentárias. EGM foram detectados em 114 (80,3%) crianças estudadas, sendo que 31 (21,8%) apresentavam altos níveis salivares desses microrganismos. Os níveis salivares de EGM foram dependentes do número de dentes irrompidos na cavidade bucal. Observou-se correlação entre os níveis salivares de EGM e o número de crianças com cárie dental e também com o nível desses microrganismos e o número de lesões diagnosticadas, sendo que o coeficiente era maior quando as cáries iniciais (manchas brancas eram levadas em consideração). Concluíram que uma alta contagem de EGM em crianças da faixa etária do estudo, apresentava uma associação positiva com a frequência e severidade da cárie dental.

Straetemans et al., 1998, estudaram a correlação entre experiência de cárie e colonização de EGM e lactobacilos em crianças caucasianas. Das 30 crianças sem EGM detectável aos cinco anos de idade, 22 adquiriram EGM aos 11 anos, mas com níveis mais baixos do que o grupo controle. As crianças colonizadas antes dos cinco anos de idade tinham aos 11 anos, maior número de EGM do que as que foram colonizadas depois dos cinco anos de idade. O estudo sugere que a colonização de EGM após a primeira janela de infectividade (Caufield et al.,1993) resulta na redução da experiência de cárie nas dentições decídua e permanente.

Splieth & Bernhardt, 1999 investigando a colonização de fissuras dentais de 230 crianças de seis a sete anos de idade, encontraram associação entre baixa contagem de EGM e baixa incidência de cárie.

Angulo et al., 1999 estudando a prevalência de cárie e sua correlação com bactérias em 76 crianças uruguaias de três a cinco anos de idade encontraram EGM em 32 delas (42%), sendo que 6 (8%) com $= 10^5$ ufc/ml, e apenas uma delas com *Streptococcus sobrinus*. Os níveis de EGM correlacionavam-se à experiência de cárie. As 25 crianças com cárie tinham ceo médio de 5,7.

Thibodeau & O'Sullivan,1999 afirmaram que avaliações anuais dos níveis de EGM permitem identificar o risco de cárie na dentição decídua e mista. Foram examinadas 83 crianças afro-americanas e descendentes de hispânicos com idade média de 3,8 anos durante seis anos. Em 16 crianças não foi possível detectar EGM; 36 delas tinham moderado risco (1 - 50ufc/mL) e 31, alto risco (> 50ufc/mL). Oitenta por cento das crianças com três anos de idade estavam colonizadas por EGM e foram mais suscetíveis à cárie nas dentições decídua e permanente. Os resultados sugerem que existe uma correlação entre colonização precoce de EGM e cáries em ambas as dentições.

Examinando a associação entre a contagem de EGM, *Lactobacillus*, *Actinomyces* e *Veillonela* em 140 crianças sul-africanas de cinco anos de idade,

Toi et al., 1999 verificaram que mais de 60% delas tinham cárie não tratada correlacionando-se positivamente com a contagem de EGM, mas não encontrou relação dos índices de ceo e os outros microrganismos avaliados.

Twetman et al., 1999 pesquisando 108 crianças suecas indicadas para tratamento odontológico sob anestesia geral, encontraram alta contagem de EGM pré-tratamento correlacionando-se positivamente com a prevalência de cárie.

Comparando 172 crianças italianas de seis (84) a oito (88) anos de idade com o objetivo de analisar os índices de prevalência de cárie, contagem de EGM e lactobacilos, Campus et al., 2000 constataram que a maioria das crianças tinha cárie (75%). A porcentagem dos níveis de EGM e lactobacilos relacionava-se com os índices de prevalência de cárie no grupo mais jovem e os índices de placa eram maiores na faixa etária mais elevada.

Okada et al., 2002 analisaram a colonização de EGM em 77 crianças japonesas em idade pré-escolar (três a cinco anos de idade) e encontraram 72,8% colonizadas por *Streptococcus mutans* e 61,1% por *Streptococcus sobrinus*. Dezenove delas (24,7%) albergavam apenas *Streptococcus mutans* e dez (13%) apenas *Streptococcus sobrinus*. A colonização por ambas as espécies foi detectada em 37 (48,1%) das crianças e 11 (14,3%) eram negativas para ambas as espécies. Os índices de prevalência de cárie eram mais altos quando estas duas espécies estavam presentes, quando comparados com a colonização de apenas *Streptococcus mutans*.

Okada et al., 2005 em estudo de um ano com 60 pré-escolares (três a cinco anos de idade) compararam a incidência de cárie com a colonização por EGM. A prevalência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* encontrada foi de 61,7% e 56,6%, respectivamente. Em 13 (21,7%) crianças albergavam apenas *Streptococcus mutans*, 10 (16,6%) apenas *Streptococcus sobrinus* e 24 (40%) eram colonizados por ambas as espécies. Entretanto não foi possível a detecção de EGM em 13 (21,7%). Crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* tinham maiores índices de

prevalência de cárie do que as colonizadas apenas por *Streptococcus mutans* ($p < 0,05\%$).

2.2. Síndrome de Down.

A mais freqüente causa genética de retardo mental, foi descrita por Langdon Down em 1866 (DOWN, 1866). Le Jeune et al. (1959) demonstraram que a síndrome era resultante da presença extra do cromossomo 21 .

A Síndrome de Down (SD) é a anormalidade cromossômica autossômica mais comum, com incidência em torno de 1:600 a 1:1000 nascimentos, sendo que 95% dos pacientes têm trissomia do cromossomo 21 (47XX ou 47XY,+21), resultante de não-disjunção meiótica. A possibilidade do erro meiótico aumenta com a idade materna. Podem apresentar translocação robertsoniana (4%), cujo cariótipo é 46,XX ou 46,XY,-14,+t(14q21q), sendo que o paciente é trissômico para o 21q e translocação rara de 21q21q. Cerca de 1% dos pacientes tem mosaïcismo e o fenótipo, nesses casos, pode ser mais leve que a trissomia 21 típica (Nora & Fraser, 1991; Thompson et al., 1993; Baraitser & Winter, 1996; Desai & Fayetteville, 1997; Hattori et al., 2000).

As implicações médicas da SD incluem distúrbios cardíacos congênitos, anormalidades de desenvolvimento, traços dismórficos, tendência à doença de Alzheimer, maior risco à leucemia e deficiências imunológicas e endócrinas (Hattori et al., 2000).

As alterações crânio-faciais e bucodentais são características na SD, com predominância de prognatismo mandibular, agenesias dentais, alterações na cronologia de irrupção dos dentes, interposição lingual e dentes mal posicionados (Brown & Cunningham, 1961; Jensen et al., 1973; Jara et al., 1993; Ondarza et al., 1995; Ferreira et al., 1998).

2.2.1. Síndrome de Down, estreptococos do grupo mutans e cárie.

Examinando 123 portadores de SD com idades de três a 30 anos, institucionalizados, Cohen & Winer (1965) encontraram um menor número de superfícies cariadas e obturadas do que no grupo controle de pacientes das mesmas instituições não sindrômicos, bem como um menor número de dentes permanentes erupcionados nos pacientes com SD.

Wolf (1967) comparou 100 portadores de SD com outros portadores de deficiência mental, todos institucionalizados de dois a 53 anos de idade. O número encontrado de fóssulas e fissuras nos dentes permanentes dos pacientes com SD foi menor, o que poderia justificar o número reduzido de cárie de superfície oclusal. Quarenta e sete por cento dos portadores de SD não tinham cárie, sendo que 12 crianças (100%) de zero a seis anos e 16 (72,7%) delas com idade entre sete e doze anos.

Kroll et al. (1970) examinaram 149 pacientes com SD de cinco a 25 anos de idade constatando CPOD=7,5, sendo que no grupo controle (159 pacientes com deficiência mental) o valor foi de 6,9. A prevalência de cárie encontrada nos pacientes com SD não foi diferente dos pacientes do grupo controle.

Analisando 416 pacientes neozelandeses com SD de cinco a 24 anos de idade, Cutress, 1971 constatou que indivíduos com SD institucionalizados, têm menores índices de cárie que os que vivem com a família, o mesmo acontecendo com as crianças não sindrômicas do grupo controle. Foi constatado também um menor número de dentes permanentes erupcionados nos portadores de SD.

Gullikson, 1973 não observou diferenças significativas entre os índices de CPOD e ceo de 202 crianças com deficiência mental de três a dez anos de idade, dentre as quais 28 com SD. Dentre estas últimas, 46% estavam livres de cárie em contraste aos 27% grupo com deficiência mental.

A experiência de cárie de 212 pacientes com SD (100 institucionalizados) de cinco a 20 anos de idade foi comparada a de seus irmãos (124) por Orner, 1975. As crianças sindrômicas apresentaram um terço menos de lesões que seus irmãos, cujo índice foi o mesmo de crianças normais. Os resultados encontrados são reflexo da expressão da trissomia do cromossomo 21, que afetaria a resposta à doença cárie.

Analisando a experiência de cárie de 55 franceses com SD de sete a 29 anos institucionalizados, Loiseau & Nardoux, 1976 encontraram uma prevalência três vezes menor nesses pacientes e dentes permanentes mais freqüentemente tratados que dentes decíduos (3,87 dentes cariados por indivíduo). A menor prevalência de cárie nos indivíduos com SD estaria associada à erupção retardada e diastemas freqüentes.

Le Clech et al. (1986) acompanharam 114 crianças trissômicas 21 desde o nascimento até dez anos de idade. Constataram que nenhuma criança teve irrupção dentária antes de seis meses de idade, sendo que 64% tiveram seu primeiro dente entre 12 a 18 meses. Na maioria das crianças o primeiro dente a irrupcionar foi um incisivo (geralmente o inferior), a cronologia de irrupção e posição dental estavam alteradas. Dezessete por cento dos pacientes tinham agenesias dentárias, com prevalência maior do incisivo lateral inferior. Em 980 dentes examinados somente oito superfícies estavam cariadas. Estas características encontradas são peculiares aos pacientes com SD.

Comparando a experiência de cárie entre 56 pacientes dinamarqueses com SD e 232 com retardo mental de seis a 19 anos, Vigild, 1986 encontrou no total da população estudada, 60% de indivíduos no grupo de seis a 12 anos e 29% do grupo de 13 a 19 anos, livres de cárie. Os indivíduos institucionalizados (51% deles sem experiência anterior) tinham menor prevalência de cárie dos que viviam com a família (apenas 13% sem experiência anterior). Os pacientes com SD tinham menor prevalência de cárie e menos dentes presentes que os não sindrômicos. No grupo de faixa etária mais elevada, 71% das crianças com SD

institucionalizadas apresentavam-se livres de cárie, enquanto apenas 21% das residentes com a família não tinham experiência anterior da doença. Comparadas às crianças com retardo mental, as com SD tinham menor índice de cárie independente do lugar em que viviam.

Sanz et al., 1989 investigando 95 pacientes com SD de seis a 21 anos de idade encontraram índices de CPOD=5,41; CPOS=8,51; ceo=1,41 e ceos=1,52. A prevalência de cárie aumentava com a idade.

Bianchi et al., 1991 encontraram maior prevalência de cárie em 192 pessoas com SD de três a 26 anos, sendo que mais da metade dos pacientes tinham dentes cariados e não tratados. Os pacientes sindrômicos tinham mais dentes perdidos que o grupo controle. Atribui-se à maior quantidade de placa encontrada nos pacientes com SD como sendo um reflexo do descuido com a saúde bucal.

A prevalência de cárie de 32 crianças com SD institucionalizadas (oito a 13 anos de idade) e sua correlação com a colonização de *Streptococcus mutans* e pH salivar foi estudada por Stabholz et al., 1991. O CPOS ($1,2 \pm 4,0$) encontrado foi menor que o de crianças não sindrômicas ($14,5 \pm 8,3$) e crianças com retardo mental ($15,6 \pm 19,2$) do grupo controle. A contagem de *Streptococcus mutans* foi menor nos pacientes com SD ($37,2 \text{ ufc/mL}$), sendo que nos pacientes não sindrômicos foi de $48,2 \text{ ufc/mL}$ e nos com retardo mental de $93,9 \text{ ufc/mL}$. Oitenta e quatro por cento das crianças com SD não tinham cárie. A contagem de EGM correlacionava-se com o CPOS em todos os grupos. Não houve correlação entre pH salivar e prevalência de cárie.

A prevalência de cárie em 75 crianças japonesas com SD, de dois a oito anos de idade, e a correlação com anticorpos contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* foi estudada por Morinushi et al., 1995. Os resultados mostraram 46,1% dos pacientes livres de cárie sendo que 61,4% até cinco anos de idade não tinham experiência anterior da doença. O Índice de Severidade de Cárie (Original Caries Severity Score - OCSS) na dentição decídua foi de 15,9 e a

maior freqüência de cárie foi na face oclusal seguida das faces interproximais e de incisivos superiores. Os autores consideraram a severidade de cárie em SD como sendo bipolar: indivíduos sem cárie e os com envolvimento severo. A correlação entre OCSS e títulos de IgM para *Streptococcus mutans* foi positiva, o mesmo não acontecendo em relação a *Streptococcus mitis*. Não ficou claro entretanto, se os níveis de anticorpos são protetores e responsáveis pela redução de cárie nos pacientes com trissomia 21.

Schimidt, 1995 investigando níveis salivares de EGM, capacidade tampão e sua correlação com a ocorrência de cárie em 97 crianças com SD de seis a 14 anos de idade, encontrou cinco delas livres de cárie. Os resultados mostraram: 14 crianças com contagem $< 10^5$ ufc/mL; 22 igual a $10^5 - 10^6$ ufc/mL e 56 crianças com EGM = 10^6 ufc/mL. O maior número dos pacientes (15) com contagem = 10^6 ufc/mL tinham entre 9 -10 anos de idade, oito delas de 8 - 9 anos e nove, de 10 -11anos. A correlação de níveis de EGM e escore de cárie para dentes decíduos e permanentes foi significativa, mas não esteve associada à capacidade tampão da saliva. Foi observado que a maioria das crianças com SD tinham de moderado a alto risco de cárie.

Fiorati et al., 1999 corroboram estes resultados investigando 25 pacientes SD com idade entre seis e 36 anos, pois 32% dos pacientes tinham alta prevalência, 40% - média e 4% - baixa. Seis deles estavam livres de cárie e tinham entre seis e 15 anos de idade.

Estudando 51 pacientes turcos com SD de seis a 24 nos de idade, Yarat et al., 1999 não encontraram diferença significativa quanto aos índices de prevalência de cárie comparando-os com os do grupo controle.

Araújo, 2000 estudando a prevalência de cárie em 42 crianças brasileiras com SD de zero a 60 meses, encontrou 26 delas livres de cárie. Apenas 15% das crianças examinadas nunca haviam recebido atenção odontológica.

Campos, 2001 pesquisando a contagem e prevalência de EGM em 40 crianças com SD (faixa etária de até 12 anos de idade), encontrou 23 (57,5%) colonizadas por *Streptococcus mutans*, sendo que seis (15%) albergavam também *Streptococcus sobrinus* (com menos de 10^5 ufc/mL). Dezesesseis crianças apresentam níveis de *Streptococcus mutans* menores que 10^5 ufc/mL, seis com níveis entre 10^5 - 10^6 ufc/mL. Apenas uma criança com cinco anos de idade apresentou 10^6 ufc/mL. Dezesete crianças não apresentavam níveis detectáveis de EGM e nenhuma delas estava monocolonizada por *Streptococcus sobrinus*.

Marinho de Jesus, 2002 examinando 26 crianças com SD com idade entre 12 e 48 meses (24 de média), encontrou apenas quatro (7,69%) delas com manchas brancas e cavidades de cárie. Em metade delas não foi possível a detecção de EGM. O nível de colonização por *Streptococcus mutans* aumentava significativamente com a idade das crianças.

Os cuidados dentais de crianças com SD e seus irmãos foram comparados por Allison & Lawrence, 2004. Através de um estudo cruzado seccional foram aplicados questionários em pais pertencentes à Sociedade Canadense de Síndrome de Down (um para filhos com SD e outro para filhos sem a síndrome). Foram distribuídos 2327 questionários; 1221 questionários para SD e 950 sem para irmãos sem SD foram devolvidos. A análise pareada para indicadores de cuidados dentais foi instituída para 938 pares de famílias, estratificados por idade. Os resultados mostraram-se semelhantes quanto ao comportamento ou experiência de cuidados dentais para ambos os grupos analisados, que tinham idades de zero a 18 anos. Dependendo da idade das crianças com SD quando comparadas aos seus irmãos na mesma faixa etária, alguns familiares (0 - 47%) dispensavam cuidados diferenciados às crianças com trissomia 21. A maior diferença observada foi quanto à época da primeira consulta e tratamento odontológico, mais cedo em pacientes com SD.

A maioria dos autores considera a prevalência de cárie nos pacientes com SD, independente de sua idade, quando comparada a de grupos controle como sendo menor (Cohen & Winer, 1965; Creighton & Wells, 1966;

Wolf, 1967; Cutress, 1971; Jensen et al., 1973; Orner, 1975; Loiseau & Nardoux, 1976; Barnett et al., 1986; Le Clech et al., 1986; Vigild, 1986; Shapira et al., 1991; Stabholz et al., 1991; Araújo, 2000). Entretanto diferença significativa não foi encontrada na prevalência de cárie pelos seguintes autores: Kroll et al., 1970; Gullikson, 1973; Steinberg & Zimmerman, 1978 e Yarat et al., 1999. Apenas Bianchi et al., 1991 constataram uma prevalência maior, sendo que Morinushi et al., 1995 consideraram a severidade de cárie em indivíduos com SD como sendo bipolar: indivíduos sem cárie e os com envolvimento severo.

Apesar de Borea et al., 1990 e Bianchi et al., 1991 encontrarem correlação entre a higiene bucal e cárie nos pacientes com SD, Brown & Cunningham, 1961 e Bigeard et al., 1990 concordaram que este fato não é relevante em relação à prevalência da cárie nos mesmos. A integridade dos tecidos bucais, no entanto, depende da correta higienização da boca que contribui para o controle do biofilme dentário. Os pacientes com trissomia 21 apresentam e déficit intelectual e dificuldades motoras o que dificulta a instituição de adequados hábitos de higienização.

A dentição de pacientes com trissomia 21 completa-se posteriormente a de criança não sindrômicas. A decídua por volta do terceiro e quarto ano de vida (Crespo, 1987) podendo chegar até o quinto ano, incompleta (Jara et al., 1993). A primeira “Janela de infectividade” que em crianças não sindrômicas acontece dos 19 - 31 meses de idade (Caufield, 1991), poderia então acontecer mais tarde em pacientes trissômicos 21, de acordo com a irrupção de dentes.

As ausências dentárias e conseqüentes espaçamentos e os atrasos de irrupção (menor tempo de exposição aos fatores cariepatogênicos) seriam responsáveis pelo menor índice de prevalência de cárie nos pacientes com SD em relação aos grupos controle, porque um menor número de dentes e superfícies dentárias estariam sendo contabilizados nesta população (Creighton & Wells, 1966; Orner, 1975; Loiseau & Nardoux, 1976; Barnett et al., 1986; Vigild, 1986; Chan, 1994).

Fatores genéticos poderiam ser responsáveis pela menor prevalência de lesões cariosas nos pacientes com SD, refletindo a expressão da trissomia do cromossomo 21 que afetaria a resposta à cárie (Orner,1975; Shapira et al.,1991). A saliva de pacientes com SD apresenta altos níveis de pH, sódio, cálcio, bicarbonato e fósforo (Winer et al.,1965; Winer & Feller,1972).

2.3. Transmissão intrafamiliar de estreptococos do grupo mutans.

Keyes, 1960 comprovou a natureza infecciosa e transmissível da cárie quando analisou a prole de hamsters em diversos experimentos em que a transferência de *Streptococcus mutans* foi estabelecida a partir do contato de animais livres de cárie e animais infectados.

Com o objetivo de estudar a possibilidade de contaminação entre indivíduos de um mesmo grupo, Jordan et al., 1972 pesquisaram através da produção de dextrano e reação com anti-soro para estreptococos do grupo *f*, ocorrência de *Streptococcus mutans* em 26 famílias, através da determinação de cepas resistentes à estreptomicina. Encontraram apenas uma mãe e seus três filhos (com idade de dois, quatro e sete anos de idade) que albergavam as mesmas cepas. Não foi observado o mesmo em relação ao pai das crianças.

Berkowitz & Jordan, 1975 comparando a produção de bacteriocinas de *Streptococcus mutans* em pares mãe-filho, encontraram significativa similaridade entre as espécies estudadas, sugerindo a transferência materna destes microrganismos.

Berkowitz et al., 1975 constataram nove pares mãe-filho com o mesmo sorotipo (*c*) de *Streptococcus mutans* quando avaliou a colonização de 138 crianças de três semanas a 14 meses de idade.

Köhler & Bratthal, 1978 pesquisando a relação entre a contagem de *Streptococcus mutans* de 36 crianças (idade entre quatro e cinco anos) e seus pais, encontraram correlação quantitativa positiva entre as mães e seus filhos. O nível de *Streptococcus mutans* correlacionava-se também com a experiência de cárie das crianças. Associaram o risco de cárie menor aos cinco anos de idade quando a contagem de *Streptococcus mutans* por ufc/mL era inferior a 10^5 .

Berkowitz et al., 1981 pesquisaram 156 crianças (oito a 18 meses) e suas mães. Foi detectado *Streptococcus mutans* em 38 crianças. A colonização de *Streptococcus mutans* das mães de crianças colonizadas por estes microrganismos foi em média de $1,16 \times 10^6$ ufc/mL de saliva. Nas mães das 118 crianças em que não foram detectados *Streptococcus mutans*, os níveis salivares de *Streptococcus mutans* eram de $2,03 \times 10^5$ ufc/mL. A frequência de infecção das crianças foi maior quando a mãe albergava mais de 10^5 ufc/mL na saliva e o risco de infecção de seus filhos foi de nove vezes maior quando esta contagem era maior ou igual a 10^6 ufc/mL. A implantação de *Streptococcus mutans* das crianças foi dependente do tamanho do inóculo bacteriano.

Rogers, 1981 avaliou a colonização de *Streptococcus mutans* em 32 famílias pela bacteriocinotipagem. O *Streptococcus mutans* foi isolado em 143 indivíduos de um total de 165 membros destas famílias. Os isolados de 28 (88%) famílias apresentaram um único padrão de bacteriocinas em dois membros no mínimo, sendo sempre em um dos pais. Em 15 (50%) famílias observou-se apenas um tipo de *Streptococcus mutans*, sendo que em dez famílias todos os indivíduos albergavam a mesma cepa. Em 12 (40%) famílias foram encontrados mais de um tipo de *Streptococcus mutans*, no entanto nenhum indivíduo apresentou isolados com mais de um padrão de bacteriocinas. Este estudo demonstrou a transmissão intrafamiliar de algumas espécies, sendo que as mães (quatro famílias) não eram a única fonte de infecção (transferência paterna em três). Em 30% das famílias, todos os membros albergavam a mesma espécie de *Streptococcus mutans*. Em uma, a fonte de *Streptococcus mutans* foi externa.

Van Houte et al., 1981 estudaram 85 crianças sem cárie e 67 com experiência de cárie com idade entre cinco e oito anos e seus pais. Os *Streptococcus mutans* foram encontrados em 59% das 85 crianças livres de cárie e em todas as que tinham cárie. Foram detectados *Streptococcus mutans* em 62% das mães de crianças e em todos os pais de crianças livres de cárie. O nível de colonização de *Streptococcus mutans* nas mães foi semelhante ao encontrado nos filhos, sendo inferior aos níveis encontrados nos pais. Todas as mães de crianças com experiência de cárie tinham *Streptococcus mutans*. Não havia

correlação entre o nível de *Streptococcus mutans* encontrado nos pais e nos filhos. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre o nível de *Streptococcus mutans* encontrado nas mães e crianças com cárie, sendo que o mesmo não foi encontrado em crianças livres de cárie. O envolvimento de *Streptococcus mutans* no desenvolvimento de cárie pôde ser comprovado, bem como a transmissão intrafamiliar, sendo que a mãe era a fonte principal de *Streptococcus mutans* para os filhos.

Köhler et al., 1983 pesquisando a transmissão de *Streptococcus mutans* entre mães e bebês, verificaram que a redução do número destes microrganismos nas mães modificava a colonização inicial nos bebês. Os resultados mostraram que 11% das crianças de mães participantes do programa de prevenção foram contaminadas com *Streptococcus mutans* e 45% no grupo controle, sendo que a porcentagem dos bebês infectados aumentava com a idade. Quando ficavam mais velhas as crianças eram expostas a outras fontes de *Streptococcus mutans* e mudanças de hábitos, além de terem maior número de dentes, o que aumentava as chances de contaminação por *Streptococcus mutans*.

Davey & Rogers, 1984 estudaram a transmissão intrafamiliar de *Streptococcus mutans* em dez famílias (46 membros). As colônias de EGM típicas foram submetidas à análise de produção de bacteriocinas. Os resultados mostraram que 43 indivíduos (95%) albergavam *Streptococcus mutans*, sendo que 23 (55%) deles apresentavam mais de um tipo de bactéria. Em três crianças com idade inferior a quatro anos, não foi detectada colonização por EGM. Similaridade de produção de bacteriocinas só foi encontrada em indivíduos relacionados. Na família A foram identificadas quatro bacteriocinas, sendo que as crianças albergavam cepas iguais as de suas mães e o pai albergava tipos diferentes. Na família B um dos filhos apresentava cepa diferente dos pais. Na família C, dois filhos eram colonizados por cepas de *Streptococcus mutans* diferentes entre si e comuns ao restante da família, sendo que o pai tinha cepa idêntica a da esposa. Na família D, três tipos de *Streptococcus mutans* foram detectados na mãe, sendo que o filho mais velho apresentava três tipos, três

outros filhos albergavam dois tipos de *Streptococcus mutans* e uma criança apenas um único tipo. Na família E, os dois filhos sem cárie estavam colonizados por uma cepa de *Streptococcus mutans* com bacteriocinotipo idêntico ao da mãe, sendo uma criança apresentava dois outros tipos não encontrados nos membros de sua família. Na família F, dois bacteriocinotipos foram detectados, sendo que a mãe albergava um tipo dos encontrados em seus dois filhos. Na família G, a mãe tinha baixo nível de contagem de *Streptococcus mutans* apesar de albergar quatro bacteriocinotipos, sendo um tipo isolado em seu esposo e em um de seus filhos. A mãe da família H apresentava dois bacteriocinotipos, sendo cada um detectado em um de seus dois filhos e o pai uma outra cepa diferente. Os dois filhos da família I estavam colonizados por uma das quatro cepas da mãe, sendo que o pai apresentava um tipo diferente de *Streptococcus mutans*. Na família J a mãe tinha colonização por três cepas, as quais foram isoladas na criança mais nova. O pai também tinha três cepas, sendo uma semelhante à da esposa. O filho mais velho tinha uma cepa idêntica à do pai e um outro tipo diferente. A diversidade de bacteriocinotipos dessas famílias, mostrando coincidência da colonização entre mães e seus filhos, sugere serem elas a principal fonte de aquisição de *Streptococcus mutans* para sua prole. No entanto devem ser considerados fatores como tamanho do inóculo bacteriano e frequência de contato entre os indivíduos na transmissão de *Streptococcus mutans*.

Berkowitz & Jones, 1985 pesquisando a colonização de *Streptococcus mutans* em 20 pares mãe-filho (idades de dez a 16 meses), através da produção de bacteriocinas com 15 cepas indicadoras, encontraram 314 cepas de *Streptococcus mutans*, sendo que 175 das mães e 139 de seus filhos. Todas as cepas de *Streptococcus mutans* inibiram no mínimo uma bactéria indicadora, sendo determinado 41 bacteriocinotipos. Catorze mães albergavam vários tipos, enquanto 13 crianças estavam colonizadas por um único bacteriocinotipo. A maioria das cepas de *Streptococcus mutans* nos pares mãe-filho apresentou um padrão de produção de bacteriocina idêntico. As mães são responsáveis pela colonização inicial de seus filhos desde a mais tenra idade, como sugerem os resultados deste estudo.

Caufield et al., 1988 analisaram a colonização de *Streptococcus mutans* em 288 pares mãe-filho, encontrando o biotipo I (sorotipo *c/f*) em 555 indivíduos e o biotipo V (sorotipo *e*) em sete. O biotipo IV (sorotipo *d/g*) foi detectado em 14 indivíduos. Plasmídios foram detectados em isolados de *Streptococcus mutans* de 19 indivíduos. Doze pares mãe-filho apresentavam no mínimo um dos membros que albergavam uma cepa de plasmídio. Através da bacteriocinotipagem e digestão de restrição plasmidial das 19 cepas de *Streptococcus mutans* foi possível classificá-los em dois grupos plasmidiais: I e II. Quatro dos sete pares mãe-filho albergavam plasmídio do grupo I e os outros, o do grupo II. Nesta pesquisa foi possível determinar um perfil idêntico entre os pares mãe-filho quanto ao grupo plasmidial, confirmando a fonte primária de infecção de *Streptococcus mutans* para seus filhos.

Caufield & Walker, 1989 estudaram cepas de isolados de *Streptococcus mutans* de três pares mãe-filho e de dois pais, através de determinação do perfil de restrição enzimática (enzima Hae III) do DNA. No caso I, a criança foi colonizada no décimo primeiro mês, no caso II, no vigésimo mês e no caso três também no décimo primeiro mês, um pouco mais tarde que o caso I. A mãe/caso I albergava *Streptococcus mutans* com três padrões de restrição, sendo que seu filho apresentou um padrão idêntico ao seu. No caso II, o par mãe-filho apresentou dois padrões idênticos, mostrando que a criança foi colonizada pelas cepas maternas. A mãe/caso III apresentava dois padrões, enquanto seu filho tinha apenas um deles. Nos três casos foi verificado que as cepas de *Streptococcus mutans* isoladas nas crianças apresentavam o mesmo perfil de restrição plasmidial das cepas de suas mães e diferentes das cepas paternas. O acompanhamento de três anos mostrou a estabilidade do perfil plasmidial dos isolados de *Streptococcus mutans* em um dos pares mãe-filho. A transmissão vertical mãe-filho ficou demonstrada, bem como uma grande heterogeneidade de cepas de *Streptococcus mutans* das mães. Entretanto apenas alguns tipos de *Streptococcus mutans* foram transferidos para os filhos.

Kulkarni et al., 1989 trabalhando com o DNA de 396 isolados de EGM para estudar da transmissão microbiana e a variedade de cepas albergadas

por membros de cinco famílias, separaram em três grupos: grupo I (16 cepas padrão), grupo II (58 cepas de 14 indivíduos) e grupo III (322 cepas dos membros de cinco famílias). Os padrões determinados para as cepas do grupo II foram únicos para cada indivíduo, enquanto observaram uma similaridade das cepas isoladas de cada família. Nas famílias 1 e 2, verificaram discreta evidência de transmissão intrafamiliar. Nas famílias 3, 4 e 5, os padrões sugeriam transmissão intrafamiliar e extrafamiliar. Nessas famílias em que foram encontradas em dois ou mais membros a mesma cepa, o isolado identificado constituía a maior proporção da população de EGM da mãe e do filho, mas não do pai. Nenhuma criança apresentou cepas idênticas a de seus irmãos, mesmo entre gêmeos idênticos apenas na família 4 o casal apresentava a mesma cepa. Ficou evidente neste estudo a importância da mãe como decisiva na transmissão de EGM para seus filhos.

Dasanayake et al., 1993 quantificaram o nível de EGM e incidência de cárie em 48 pares de mãe-filho durante os três primeiros anos de vida das crianças. Foram separados dois grupos de mães, sendo feita aplicação de um composto fluorado em apenas um deles, quando do irrompimento dos dentes de seus filhos. Neste referido grupo, houve considerável redução nas contagens de microrganismos. No entanto a avaliação após três anos, não mostrou diferença significativa na colonização de EGM e experiência de cárie entre as crianças dos dois grupos avaliados. Este estudo sugere que as aplicações de produtos com fluoretos nas mães por ocasião do irrompimento dos dentes de seus filhos, não influenciariam na incidência, período de colonização de EGM e na experiência de cárie das crianças.

Aaltonen & Tenovu, 1994 selecionaram 327 crianças com sete meses de idade e as dividiram em dois grupos baseando-se na frequência de estreito contato salivar entre mãe e filho. Cinco a sete anos depois, os bebês (55) que tiveram acompanhamento regular do desenvolvimento da dentição, foram examinados quanto à prevalência de cárie e colonização de EGM e lactobacilos. As 21 crianças que tinham maior contato com suas mães (grupo F) tiveram menor contagem de EGM na saliva do que as 34 (grupo R), que tinham menor contato.

Apenas 19% das crianças do grupo F comparado a 56% das do grupo R tiveram experiência de cárie nos molares e/ou caninos decíduos ($p < 0,01$). Uma proporção significativa de crianças do grupo F (57%), comparadas ao grupo R (27%, $p < 0,05$), tiveram alto consumo de bebidas e alimentos açucarados (relato em diário dietético de dois dias). O grupo F e o grupo R não tiveram diferença significativa com relação a outras crianças quanto a fatores de risco cárie e demais fatores estudados, como idade, gênero, estágio do desenvolvimento dental, tratamento odontológico ou aspectos sociais. Não houve também diferença entre os dois grupos quanto à experiência de cáries, níveis de EGM salivares ou contagem de lactobacilos, idade e grau de instrução de suas mães, nem quanto ao aleitamento natural. A freqüente transferência salivar materna para a boca de seus bebês antes do irrompimento de dentes foi negativamente associada com a colonização bucal por EGM e com cárie na dentição decídua. Os mecanismos de proteção imunológica (imunoglobulinas G - IgG, contra *Streptococcus mutans*) podem ser responsáveis pelos resultados apresentados neste estudo, aumentando a resistência das crianças.

Medidas preventivas para reduzir o nível de colonização de mães objetivando melhores condições de saúde bucal de seus filhos foram instituídas até a idade de três anos dos mesmos. Este grupo de pessoas foi reexaminado quando as crianças completaram sete anos de idade para avaliar a eficácia da instituição desta abordagem precoce. As mães do grupo controle apresentaram altos níveis salivares de EGM e lactobacilos quando comparadas às mães-teste ($p < 0,05$). O nível médio de contagem de EGM foi $0,6 \times 10^6$ ufc/mL de saliva das mães-teste e $1,3 \times 10^6$ ufc/mL de saliva mães-controle. *Streptococcus mutans* foram detectados em todas as mães, com exceção de uma que só albergava *Streptococcus sobrinus*. O *Streptococcus sobrinus* foi isolado em 18 (54,5%) mães-controle e em sete de suas crianças. Sete (28%) mães-teste e em apenas uma de suas crianças. A contagem de lactobacilos foi dez vezes maior nas mães-controle do que nas mães-teste (80×10^3 e 7×10^3 ufc/mL de saliva, respectivamente). Significativamente mais crianças de mães do grupo controle carregavam EGM (31 (95%) contra 12 (46%) das crianças do grupo teste) ($p < 0,01$). As crianças das mães-teste tiveram contagens menores de EGM e

lactobacilos ($p < 0,05$) e, não tiveram experiência de cárie (23%). No entanto, apenas 9% das crianças-controle eram livres de cáries ($p < 0,01$). Estes resultados encontrados por Köhler & Andreén, 1994, evidenciam que a redução da colonização de EGM em mães durante o irrompimento dos dentes de seus filhos influencia a colonização destes microrganismos e a experiência de cárie em crianças.

Li & Caufield, 1995 através de genotipagem isolaram *Streptococcus mutans* em 34 pares de mãe-filho e alguns pais, observando identidade de cepas em 71% dos pares avaliados. As cepas de *Streptococcus mutans* encontradas nas meninas apresentaram uma homologia de 88% com as isoladas nas mães e as dos meninos de 53%. Os meninos colonizados com genótipos homólogos com os de suas mães apresentaram experiência de cárie 13 vezes maior quando comparados às meninas. Não foi observada similaridade entre as cepas de *Streptococcus mutans* isolados dos pares pai-filho ou mãe-pai, sugerindo que as mães são a principal fonte de contaminação destes microrganismos para seus filhos. Foi identificada ainda, uma segunda "Janela de Infecção" por volta dos seis anos de idade dessas crianças, sendo que a mãe ainda representou a principal fonte de contaminação.

Azevedo et al., 1998 avaliando a prevalência de EGM em amostras de saliva de 50 crianças e suas mães, detectaram colonização presente em 47 (94%) crianças e em 50 (100%) mães. *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foram detectados em 15 (30%) crianças e em 24 (48%) mães, que tinham níveis de EGM correspondentes a $1,28 \times 10^6$ e $3,57 \times 10^6$ ufc/mL, respectivamente. Trinta e um (62%) pares mãe-bebês albergavam as mesmas espécies de EGM. As idades das crianças variavam de três a 12 anos, sendo que 22 (44%) tinham idade menor ou igual a sete anos e 28 (56%), maior que sete anos. Considerou-se que as crianças de idades variadas tiveram a oportunidade de contatarem-se com diferentes tipos de pessoas por um longo período de tempo, não podendo ser a mãe apontada como a única e/ou principal fonte dos microrganismos presentes na cavidade bucal de seus filhos. Ressaltaram ainda que a análise qualitativa e quantitativa de EGM, em nível de espécie, poderá

servir como critério para selecionar medidas de prevenção, tornando mais viável a relação custo versus eficiência dos tratamentos preventivos.

De Soet et al., 1998 analisaram a colonização de *Streptococcus mutans* de 21 pares mãe-filho com lábio fissurado. A técnica empregada foi a reação em cadeia de polimerase (PCR) com *primers* randômicos. As crianças apresentaram quantidades menores de morfotipos e genótipos do que suas mães. O mesmo padrão de PCR foi encontrado em 38% dos pares mãe-filho, sugerindo que *Streptococcus mutans* foi transmitido da mãe para a criança em apenas um terço da amostra estudada. Foi constatada também uma alta contagem de *Streptococcus mutans* de mães e filhos (níveis maiores que 10^4 ufc/mL de saliva).

Emanuelsson et al., 1998 analisaram a similaridade intrafamiliar de *Streptococcus mutans* através de sorotipagem e caracterização pelo perfil do DNA das cepas entre membros de famílias suíças (25 crianças de três anos, suas mães e 18 pais). Encontraram cinco crianças com cepas de EGM com genótipos diferentes de seus pais e seis com genótipos idênticos aos de suas mães. Nenhuma das crianças apresentou colonização com genótipos paternos, apesar dos mesmos apresentarem altos níveis de EGM. Não foi observada identidade de cepas em 11 casais. Os resultados sugerem que as crianças adquirem EGM preferencialmente de suas mães, de alguma fonte externa, mas não de seus pais.

Emanuelsson & Wang, 1998 investigaram a distribuição de *Streptococcus mutans* em 18 famílias chinesas (mãe, pai e único filho), cujas crianças tinham três anos de idade. *Streptococcus mutans* foi isolado do biofilme dentário de todos os membros de 11 famílias, sendo o sorotipados e genotipados. Em quatro famílias, as mães e seus filhos albergavam cepas de *Streptococcus mutans* com mesmo genótipo; em três, os pais apresentavam o mesmo genótipo dos encontrados nos filhos. Apenas um casal apresentava a mesma cepa de *Streptococcus mutans*. Em duas famílias, a colonização de *Streptococcus mutans* era a mesma em todos os indivíduos. Em uma família os indivíduos apresentavam cepas diferentes deste microrganismo entre si. O padrão de similaridade

intrafamiliar das cepas de *Streptococcus mutans* foi diferente do encontrado em famílias ocidentais.

A presença de EGM em 19 pares mães e filhos (de 18 meses a três anos de idade) foi pesquisada por Grönroos et al., 1998. A transmissão entre mãe e filho ocorreu em nove pares. Não foi detectada a presença de EGM em seis crianças. As 145 cepas de EGM isoladas foram submetidas à análise de produção de mutacinas, sorotipadas e ribotipadas. As cepas de EGM das mães foram caracterizadas em 37 ribotipos. Os isolados de um mesmo indivíduo tinham ribotipos idênticos, com mesma produção de mutacinas. A produção de mutacinas pelas cepas de EGM era estável, sendo este fator de virulência importante para a colonização e estabelecimento de SM em crianças de pouca idade.

Van Loveren et al., 1999 investigaram a similaridade entre cepas de pares de dez pares de mães e filhos, cujas crianças adquiriram EGM entre a idade de cinco e onze anos de idade. Foram isoladas 30 cepas de EGM da saliva dos participantes da pesquisa. Cada isolado foi testado quanto a sua produção de bacteriocina usando 21 cepas indicadoras. Em oito pares, o perfil de produção de bacteriocinas era idêntico na mãe e na criança. Não foi encontrada similaridade entre as famílias. O estudo demonstrou que as crianças que adquiriram EGM posteriormente à idade cinco anos apresentavam similaridade com a colonização materna, indicando transmissão intrafamiliar das cepas.

A comparação de cepas de EGM foi analisada em isolados de 11 famílias com 32 membros (mãe, pai e criança) por Emanuelsson & Thornqvist, 2000, em duas ocasiões diferentes. O perfil do DNA dos EGM encontrado mostrou similaridade dos genótipos de cepas de oito mães, cinco pais e sete crianças nos dois períodos de estudo. Em ambas as análises, três mães, cinco pais e duas crianças mostraram duas cepas de EGM similares. Seis mães apresentaram EGM diferentes nas duas ocasiões. Dois pais albergavam cepas não observadas na primeira análise. Uma criança foi colonizada por uma cepa diferente das identificadas e outra com dois novos tipos. Em três mães, seis pais e duas crianças as linhagens de EGM isoladas na primeira amostragem não

foram detectadas. As cepas de EGM apresentaram estabilidade na microbiota bucal dos indivíduos analisados neste período, sendo que foi demonstrado que pode haver mudanças da população microbiana com perda e aquisição de novos genótipos.

Li et al., 2000 correlacionaram a fidelidade de transmissão de EGM com a amamentação em 48 famílias chinesas (48 mães, 42 pais e 50 crianças com dois e três anos de idade). As amostras foram obtidas em dois períodos diferentes com intervalo de seis meses. As colônias foram identificadas e submetidas a genotipagem. As amostras de DNA foram submetidas ao PCR utilizando-se *primers* randômicos. A prevalência de EGM nos pais foi de 87,5% e nas mães de 68,2%. Nas crianças de dois anos de idade a prevalência de EGM foi de 56,3% e nas de três anos de 83,3%. Observaram uma associação positiva entre a prevalência de EGM com a idade das crianças e o número de lesões de cárie. Sessenta e seis por cento das crianças albergavam EGM e destas 46% tinham experiência de cárie. Foi constatado que entre as 38 crianças colonizadas por EGM, 17 (44,7%) apresentavam cepas com genótipos idênticos aos isolados de suas mães. Destas, 88,2% foram amamentadas e 11,8% não amamentadas. Os resultados mostraram maior fidelidade de cepas de EGM nos pares mãe-filho, quando o período de aleitamento materno era superior a nove meses, havendo um aumento do número de lesões de cárie nestes bebês.

Van Loveren et al., 2000 compararam isolados de EGM de mães, pais e filhos cujas crianças adquiriram *Streptococcus mutans* entre cinco e 11 anos de idade. Doze famílias foram analisadas e entre as 12 crianças, suas mães e oito pais, 30 isolados de EGM foram identificados a partir de atividade de bacteriocinas com 21 indicadores. Em sete das 12 mães, perfis similares aos dos filhos foram encontrados. Nos pais apenas em dois casos havia esta identidade e nestas duas famílias, todos os membros albergavam a mesma cepa de EGM. Quatro casais tinham a mesma similaridade de produção de bacteriocinas. Os resultados sugerem que mesmo que ocorra uma aquisição tardia de EGM, existe similaridade entre os isolados de crianças e seus pais e mães, comprovando a transmissão intrafamiliar destes microrganismos.

Emanuelsson & Thornqvist, 2001 com o objetivo de estudar a época de colonização de crianças não colonizadas por EGM até a idade de três anos e quando os EGM eram idênticos aos dos pais, analisaram 13 crianças sendo que dez durante cinco anos e três delas durante dois anos. Amostras do biofilme de primeiros molares foram coletadas quando estes dentes estavam presentes. Em dez crianças ainda não foi possível detectar *Streptococcus mutans* no período analisado. O DNA dos *Streptococcus mutans* das outras três crianças foi analisado, sendo o mesmo em uma garota e sua mãe e entre um menino e seu pai. No outro menino, não havia similaridade com nenhum dos progenitores. Nenhum dos treze casais analisados mostrou identidade de genótipos de EGM. Os resultados mostraram que as crianças podem continuar sem colonização de EGM quando não foram infectadas até os três anos de idade.

Dos 76 isolados de EGM de 35 crianças brasileiras de escolas maternas, 45 diferentes *fingerprints* foram identificados e analisados através de análise cromossômica por Mattos-Graner et al., 2001. Vinte e nove por cento das crianças carregavam mais de um genótipo. A variedade de genótipos encontrados sugere transmissão horizontal de EGM em crianças que passam longo tempo com outros indivíduos que não seus familiares.

Pimenta et al., 2001_b pesquisaram através de bacteriocinotipagem e determinação do perfil do DNA, a transmissão de EGM em isolados da saliva de 93 pessoas de seis famílias brasileiras constituídas de no mínimo três gerações. Os EGM foram detectados em 80 indivíduos (86%) com contagens de $3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^8$ ufc/mL de saliva. *Streptococcus mutans* estava presente em 78 (97,5%) dos indivíduos e 51(63,7%) eram monocolonizados. *Streptococcus sobrinus* ocorreu em 29 (36,3%) indivíduos, sendo dois (2,5%) monocolonizados. Vinte e sete (33,8%) eram colonizados por ambos os microrganismos. Foi comprovada a transmissão intrafamiliar de EGM entre membros de uma mesma família.

Para estabelecer a prevalência e conhecer a colonização de *Streptococcus mutans*, Thorild et al., 2002 analisaram 200 crianças (100 com 18 meses de idade, 100 com três anos de idade) e suas mães. As mães foram

questionadas quanto a história médica, hábitos de higiene e dieta. Os resultados mostraram 50% das mães com alto nível de *Streptococcus mutans*, sendo que a prevalência em seus filhos de 18 meses de idade foi de 30% e os com três anos de idade foi de 42%. Houve uma significativa correlação entre o alto nível de *Streptococcus mutans* entre crianças e suas mães ($p < 0,01$), sendo que estes níveis reportavam ao consumo diário de alimentos açucarados facilitando a infecção por *Streptococcus mutans*. A prevalência de cárie relacionava-se positivamente com o nível de colonização de SM ($p < 0,01$). A comprovada transmissão vertical é dependente da dieta e hábitos familiares.

Para explorar a homologia intrafamiliar e estabilidade longitudinal de colonização de crianças por EGM, Köhler et al., 2003 trabalharam com *fingerprint* genômico (restrição de endonuclease Hind III, eletroforese, Southern blotting e hibridização/quimioluminescência) de 254 isolados de EGM (192 de *Streptococcus mutans* e 62 de *Streptococcus sobrinus*) coletadas em 16 famílias (16 pares mãe-filho, sete pais e quatro irmãos). Quatorze pares mãe-filho apresentaram a mesma homologia de pelo menos um ribotipo pesquisado (no máximo de quatro). Seis pais tinham um ribotipo em comum com seus filhos. Dez crianças de 13 acompanhadas longitudinalmente apresentaram persistência de pelo menos um ribotipo até os 16 anos de idade. O estudo sugere a transmissão intrafamiliar de EGM e que a colonização precoce mostra uma persistência das cepas até o adulto jovem.

Li et al., 2003 revisaram os trabalhos relevantes publicados na literatura especializada, durante 15 anos, sobre a colonização de EGM e a transmissão maternal destes microrganismos. Constatou-se a necessidade de incluir-se nas pesquisas, além de afro-americanos, os brancos e minorias étnicas para maior generalização dos dados neste tipo de pesquisa na população norte americana.

Spolidorio et al., 2003 trabalharam com a análise de amplificação randomizada polimórfica do DNA para diferenciar clones de EGM em 22 famílias brasileiras (pais, mães, recém-nascidos e crianças de até 18 meses de idade).

Noventa e sete por cento de 410 isolados, foram identificados como cepas de *Streptococcus mutans*, tendo sido utilizado um mesmo *primer* (OPA-13) e perfil de banda reproduzível para a amplificação dos espécimes. Os resultados demonstraram que três bebês (13,7%) tinham o mesmo genótipo do pai, 12 mães (54,5%) carregavam o mesmo genótipo de seus filhos. Sete crianças (31,8%) albergavam cepas de *Streptococcus mutans* similares à de seus irmãos. Observou-se também um polimorfismo da espécie de *Streptococcus mutans*. Comentaram que a distribuição de EGM difere de família para família e que mesmo que a progenitora seja o principal reservatório destes microrganismos transmitidos para seus filhos, outras fontes devem ser consideradas.

Um estudo longitudinal para estabelecer a média de idade de início de colonização de *Streptococcus mutans* foi realizado com 111 crianças acompanhadas desde os seis até 24 meses de idade. Wan et al., 2003 encontraram um incremento na colonização de *Streptococcus mutans* com a idade e irrompimento dental, sendo que aos 24 meses, 84% das crianças albergavam esta bactéria ($p < 0,01$). Neste estudo um grande número de mães com crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* mostrou baixa frequência de escovação dental, alto índice de placa bacteriana e expressiva ingestão cotidiana de lanchinhos e alimentos açucarados quando comparadas às mães do grupo controle cujos filhos não eram infectados por EGM. Observaram também que a colonização por EGM associa-se positivamente à contatos próximos, íntimos e constantes entre crianças e adultos como compartilhar comidas e utensílios domésticos e dormir com a mãe, pois estes hábitos facilitam a transmissão dos microrganismos através da saliva.

Zanata et al., 2003 em estudo longitudinal com 81 primigestas de baixo nível socioeconômico, avaliaram o efeito de medidas preventivas, educação em saúde e intervenção odontológica na condição bucal de seus filhos aos dois anos de idade da criança, a prevalência de cárie foi observada. O número de superfícies cariadas (incluindo áreas desmineralizadas) foi mais alto entre crianças do grupo controle quando comparadas ao grupo experimental (6,3 x 3,2). O incremento de cárie nas mães foi fator decisivo na experiência de cárie dos

filhos, suportando a evidência da associação entre a prevalência de cárie em bebês e fatores ligados à mãe, como saúde bucal, hábitos e comportamentos familiares. As necessidades prementes de gestantes carentes são maiores que a preocupação com a saúde bucal.

A detecção de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* na saliva e biofilme dentário foi estudada por Amoroso et al., 2004 em 20 famílias com crianças em idade escolar, através de identificação fenotípica (Gram e testes bioquímicos) e reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizada para amplificação do gene da glicosiltransferase. Nos exames com PCR do biofilme dentário, *Streptococcus mutans* foi encontrado em vinte indivíduos (90,9%) e não foi detectado em apenas duas pessoas (9,0%), que apresentaram *Streptococcus sobrinus*. *Streptococcus mutans* foi encontrado na saliva de vinte pessoas (90,9%) e *Streptococcus sobrinus* na saliva de três (13,6%). O estudo sugere que o PCR pode ser utilizado em estudos de transmissão intrafamiliar de EGM. A especificidade do PCR para *Streptococcus mutans* no biofilme dentário foi de 66,67% e a sensibilidade de 100% e para amostras de saliva a sensibilidade foi de 95% e a especificidade de 50%. A especificidade para detecção de *Streptococcus sobrinus* para amostras de saliva foi de 95% e de biofilme dentário foi de 100%, enquanto que a sensibilidade para amostras de saliva foi de 100% e de biofilme dentário 50%. O exame odontológico das crianças constatou um ceo (índice de prevalência de dentes decíduos cariados, extraídos e obturados) igual a 2,5. O CPOD (dentes permanentes cariados perdidos e obturados) dos adultos foi de 19,08. A correlação entre o número de ufc/mL de EGM na saliva de mães e filhos foi significativa para o grupo de crianças que apresentaram cárie e não foi significativa para o grupo de crianças sem cárie. Foi detectado colonização por *Streptococcus mutans* em 100% das crianças sem cárie.

Guimarães et al., 2004 questionaram a correlação entre a atividade de cárie de 51 crianças (dois meses a cinco anos de idade) e de suas mães relacionados a níveis de *Streptococcus mutans*. Observaram não haver evidência de que o nível de *Streptococcus mutans* presente na cavidade bucal das crianças tivesse relação com sua idade e que não ocorreu associação entre atividade de

cárie e aumento do número destes microrganismos. No entanto havia evidência de associação entre atividade de cárie nas mães e seus filhos.

Um estudo longitudinal de 20 meses sobre transmissão, diversidade e estabilidade de genótipos de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foi delineado por Klein et al., 2004 com 16 pares de mãe-filho. O CPOD das mães era de $10,4 \pm 6,3$. As crianças ficavam em creches durante dez horas, cinco dias por semana e pertenciam a baixo nível socioeconômico. Foi realizado o PCR para caracterizar 968 isolados de *Streptococcus mutans* e 111 isolados de *Streptococcus sobrinus*. Na análise da primeira colonização por EGM observou-se que as crianças albergavam de uma a quatro cepas de *Streptococcus mutans* e apenas um genótipo de *Streptococcus sobrinus*. O exame bimensal mostrou que a maioria dos genótipos adquiridos da mãe persistia, mas outros também eram adquiridos, mostrando a transmissão vertical e o constante desenvolvimento da microbiota bucal na infância.

Lindquist & Emilson, 2004 estudando a colonização de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e sua relação com a prevalência de cárie em crianças cujas mães albergavam ambas as espécies, demonstraram que a maioria das crianças (10/15) adquiriu EGM durante o período do estudo (sete anos). No entanto apenas quatro delas tinham *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* apesar das todas as mães terem ambos os genótipos. Em duas crianças, *Streptococcus sobrinus* foi detectado posteriormente a *Streptococcus mutans*. Num total de 26 genótipos analisados, nove eram idênticos aos das mães. Novas cepas foram notadas em crianças, mas também em suas mães. A incidência de cárie foi baixa enquanto durou o estudo, sendo que oito crianças não tiveram a cárie.

Li et al., 2005 comentam que os eventos perinatais (peso do bebê, tipo de aleitamento e de parto), idade, escolaridade e, saúde da mãe na gravidez e ainda, nível socioeconômico familiar, influenciam a aquisição e colonização de EGM. Em 156 pares de mãe primigesta e filho, 55 crianças foram colonizadas por *Streptococcus mutans*. Dos 50 pares que completaram este estudo longitudinal de

quatro anos, 37 (88,9%) das crianças tinham o mesmo genótipo de *Streptococcus mutans* da mãe, com 100% de fidelidade de uma mesma cepa. As nascidas de parto cesárea eram infectadas por *Streptococcus mutans* 11,7 meses mais cedo que as de parto normal.

Barone et al., 2005 investigaram a possível similaridade entre as cepas de EGM de cinco crianças com SD com idade média de dez anos e suas mães, usando análise do perfil do DNA. Os isolados foram genotipados através da PCR com os *primers* OPA 02 e OPA 03. Todos os indivíduos da amostra (12) apresentavam *Streptococcus mutans* e nenhum *Streptococcus sobrinus*, sendo que estes resultados após seis meses, repetiram-se. No par controle (mãe e criança sem SD), a criança adquiriu um genótipo idêntico a uma das cepas de sua progenitora. Os resultados mostraram as cinco crianças SD carregando EGM diferentes de suas mães. Após seis meses, novas amostras foram coletadas de todos os participantes, mostrando que as crianças SD estavam colonizadas por novas cepas. Os resultados mostraram uma mudança maior na microbiota de crianças SD quando comparadas a criança do grupo controle. Esta foi a única pesquisa recuperada na literatura em que a transmissão de EGM em pares de mães e filhos com SD foi investigada.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

3.1.1. Isolamento, contagem, tipagem fenotípica e genotípica de estreptococos do grupo mutans (EGM) da saliva de crianças com Síndrome de Down (SD) e suas mães.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1 Isolamento, identificação de EGM em crianças com Síndrome de Down e de suas mães

3.2.2. Contagem de EGM da saliva de crianças com Síndrome de Down e de suas mães

3.2.3. Determinar a produção de bacteriocinas pelas cepas de EGM

3.2.4. Tipagem de cepas de EGM através da caracterização do DNA bacteriano pela determinação do perfil de restrição enzimática (Hae III)

3.2.5. Determinar a prevalência de cárie das crianças com Síndrome de Down e de suas mães (índices ceo e CPOD, respectivamente)

4. Metodologia

O estudo foi submetido ao Conselho Regional de Medicina de Goiás segundo os princípios de Bioética e normas da resolução n. 196/96 para pesquisa em seres humanos do Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde, 1996. O consentimento esclarecido e informado foi usado antes de qualquer procedimento da pesquisa (Anexo 1).

4.1. Coleta, isolamento e identificação dos estreptococos do grupo mutans

Amostras de saliva de 16 (dezesseis) crianças com Síndrome de Down por trissomia simples do cromossomo 21 de ambos os gêneros com até 12 anos de idade, dentes irrompidos e de suas mães, que não estivessem fazendo uso de medicação antimicrobiana há um mês foram selecionadas na Clínica do Projeto de Extensão GEPETO (Grupo de Estudo em Pacientes Especiais e Tratamento Odontológico) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. As amostras de saliva não estimulada foram coletadas por único examinador responsável, com espátulas de madeira previamente autoclavadas e, semeadas em meio seletivo SB 20 (Davey & Rogers, 1984), pela técnica de impressão preconizada por Kölher & Bratthall (1979). As placas de ágar SB20 foram incubadas em microaerofilia a 37°C durante 72 horas.

As colônias com características macroscópicas de estreptococos do grupo mutans (EGM), desenvolvidas numa área de 1,50 cm², foram contadas por único avaliador, com o auxílio de um estereomicroscópio sob luz refletida, sendo então transferidas para caldo tioglicolato e submetidas à identificação bioquímica, segundo Beighton et al., 1991_b, modificado por Ito et al., 1993 e identificação fenotípica. As colônias foram armazenadas em leite desnatado a 10,0% e posterior caracterização genotípica. As cepas identificadas como estreptococos do grupo mutans foram caracterizadas pela antimicrobianotipagem, produção de bacteriocinas e a caracterização pela determinação do perfil de restrição enzimática (Hae III).

A contagem de unidades formadoras de colônia por mL (ufc/mL) de saliva de EGM foi estimada comparando-se a média do número de colônias na espátula com os critérios segundo Köhler & Bratthal (1979). A contagem de colônias de zero a 20 unidades expressa ufc/mL de saliva $<10^5$; de 21-100 colônias expressa entre 10^5 - 10^6 ufc/mL de saliva e número ≥ 100 refere-se a $\geq 10^6$ ufc/mL de saliva.

4.2. Bacteriocinotipagem

As colônias de estreptococos do grupo mutans (EGM) foram avaliadas quanto à produção de bacteriocinas (mutacinas) utilizando a técnica do antagonismo posposto (Azevedo et al., 1985). Os estreptococos foram cultivados em caldo tioglicolato de sódio a 37°C por 24 horas. A cultura foi transferida com o inoculador de Steers (Steers et al., 1959) e aplicadas em placas com ágar infusão de cérebro e coração. As placas foram mantidas à temperatura ambiente para secagem dos inóculos, seguida por incubação em microaerofilia a 37°C por 48 horas.

As cepas utilizadas como indicadoras (*Micrococcus luteus* 4391, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*), previamente selecionadas para a detecção da produção de bacteriocinas, foram semeadas em caldo tioglicolato de sódio e incubadas a 37°C por 24 horas. Os inóculos correspondentes às películas indicadoras foram preparados utilizando-se caldo infusão de cérebro coração (BHI) suplementado com 1,0% de ágar, com uma concentração final de 10^6 a 10^7 ufc/mL, cuidadosamente vertido sobre a superfície das placas de BHI semeadas com as cepas teste. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram reincubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas, e posteriormente observado a zona de inibição da cepa indicadora ao redor dos pontos de inoculação das cepas teste.

Para a interpretação da produção de bacteriocinas foi utilizado um sistema de transformação, preconizado por Farmer III (1970), Azevedo (1988) e van Loveren et al. (2000), apresentado na Tabela 1. Assim, em função do comportamento dos EGM frente às cepas indicadoras têm-se padronizado um código. O sinal positivo (+) indica a produção de bacteriocina para a bactéria indicadora. O sinal negativo (-) indica a não produção de bacteriocina pela bactéria teste. Por exemplo, quando a cepa teste não produzir bacteriocina frente a qualquer das três cepas o dígito que identificará a mesma será zero, e assim por diante.

Tabela 1. Sistema de confirmação de produção de bacteriocinas contra três bactérias indicadoras

Código	Bactéria indicadora			Código	Bactéria indicadora		
	1	2	3		1	2	3
0	-	-	-	4	-	+	+
1	+	-	-	5	-	-	+
2	+	+	-	6	+	-	+
3	+	+	+	7	-	+	-

Legenda: - bactéria não produtora de bacteriocina contra a bactéria indicadora
 + bactéria produtora de bacteriocina contra a bactéria indicadora

Desta maneira, cada isolado de EGM teste receberá um código de acordo com sua produção de bacteriocina. A coincidência do código implica que os microrganismos apresentaram o mesmo comportamento frente às bactérias indicadoras, sendo pertencentes ao mesmo grupo de produção de bacteriocinas.

4.3. Determinação do perfil de restrição enzimática: caracterização genotípica dos *Streptococcus mutans*

4.3.1. Extração do DNA total

Após a identificação fenotípica, alguns estreptococos do grupo mutans isolados de indivíduos com perfil de produção de bacteriocinas similar, foram submetidos à determinação do perfil de restrição enzimática. O DNA total foi extraído de acordo com a técnica descrita por Caufield & Walker, 1989 e Emanuelsson, Li & Bratthall, 1998.

Os EGM foram cultivados em 5,0mL de caldo infusão de cérebro e coração a 37°C por 24 horas. Adicionou-se ao cultivo 0,25g de glicina sendo incubado a 37°C por 45 minutos. A cultura foi transferida para microtubos, tipo *ependorf*, de 1,5mL, e centrifugada a 15000g por um minuto. O precipitado foi lavado com tampão Tris-HCl 0,1 mol/L e ressuspenso em 150,0µL de tampão de lise (glicose 50mmol/L; Tris-HCl 10mmol/L; EDTA 10mmol/L; pH 8,0) e

homogeneizado suavemente em vortex. Foram adicionados 141,0 μ L de tampão de lise contendo 10,0 mg/mL de lisozima e homogeneizado suavemente por agitação manual.

Para acelerar o processo de lise celular, foram adicionados 9,0 μ L de cloreto de sódio 5mmol/L (concentração final de 0,1mol/L) e 150,0 μ L de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10,0% e homogeneizado por agitação manual branda. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado 450,0 μ L de fenol-clorofórmio (1:1, v/v) e o tubo agitado em vortex. A mistura foi, então, centrifugada a 15000g por três minutos, o sobrenadante retirado e novamente submetido a uma extração com clorofórmio, sendo o tubo agitado em vortex e centrifugado a 15000g por 3 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionado de 900,0 μ L de etanol 95,0% gelado.

O material foi incubado a -70°C por 20 minutos ou a -20°C por 2 horas e posteriormente centrifugado a 15000g por dez minutos. O sobrenadante era descartado e o precipitado ressuspenso em 250,0 μ L de tampão de lavagem (Tris-HCl 0,1mol/L; acetato de sódio 0,1 mol/L; pH 7,0) e novamente adicionado de 500,0 μ L de etanol gelado. A suspensão era incubada a -70°C por 20 minutos e depois centrifugada a 15000g durante dez minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 100,0 μ L de água deionizada bidestilada e estocado a 4°C até ser utilizado para a digestão enzimática.

4.3.2. Digestão do DNA total

A digestão do DNA total dos estreptococos do grupo mutans foi realizada com a enzima de restrição *Hae* III, segundo as instruções do fabricante. Para tanto, foram utilizados 20,0 μ L do DNA total; 1,5 μ L da enzima; 3,0 μ L de tampão e 5,5 μ L de água deionizada bidestilada.

4.3.3. Determinação do perfil de restrição enzimática

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8%, em tampão TBE (Tris 89,0mmol/L; EDTA 25,0mmol/L; ácido bórico 89,0 mmol/L; pH 8,6), sendo realizada a 40 volts por 4 horas a temperatura ambiente. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta, fotografado e os perfis de restrição analisados.

4.4. Determinação do índice de prevalência de cárie de crianças com Síndrome de Down e de suas mães

Os exames clínicos para determinação da prevalência de cárie de crianças com Síndrome de Down e de suas mães foram realizados por um único examinador previamente treinado e calibrado. As mães e crianças com Síndrome de Down foram examinadas no ambulatório de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Todos os pacientes foram atendidos no Programa de Extensão GEPETO (Grupo de Estudo de Pacientes Especiais e Tratamento Odontológico). Após anamnese, realização de profilaxia profissional, secagem e sob iluminação do refletor do equipo odontológico, foi feito o exame clínico, tomando-se o dente como unidade de estudo conforme metodologia preconizada pela OMS (1997), não sendo consideradas manchas brancas. A experiência de cárie foi obtida através da soma de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) nas mães e dentes decíduos cariados, com extração indicada ou obturados (ceo) para as crianças.

5. Resultados

Na Tabela 2 encontram-se descritos os níveis de unidades formadoras de colônia por mililitro (ufc/mL) de mães e filhos com Síndrome de Down; a idade das crianças e de suas mães ao nascimento dos infantes e o perfil de produção de bacteriocinas (mutacinas) identificado nos isolados. Os numerais expressam o comportamento frente às bactérias indicadoras, conforme o sistema de transformação descrito anteriormente. Os isolados foram considerados similares quando apresentam um perfil de bacteriocinas muito semelhante. A coincidência do perfil de produção de bacteriocina entre os indivíduos do par implica que as bactérias apresentaram um perfil de produção muito semelhante, tendo provavelmente o mesmo genótipo. Apenas três pares de mãe-criança com SD apresentaram esta similaridade fenotípica (Pares 1, 6 e 14, identificados (na cor vermelha, na Tabela 2).

A colonização de EGM, a prevalência de cárie de mães e filhos com SD (CPOD e ceo, respectivamente), o nível de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e o gênero também estão dispostos nesta Tabela 2. Os resultados mostram um CPOD alto nas mães e ceo baixo nos filhos. Uma mãe (Par 9) EGM-negativo tinha alto CPOD (25), mas todos os dentes tratados e sua filha sem experiência de cárie aos dois anos de idade, contrastando com uma contagem de 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans*. As outras duas mães EGM-negativo tinham dois meninos com cinco anos de idade, sendo que um era também EGM negativo (Par 15) e o outro com contagem milionária (10^6) de *Streptococcus mutans* (Par 16). No entanto apenas o garoto EGM-negativo (Par 15) tinha ceo mais baixo (4), quando comparado ao outro milionário-mutans com ceo=17 (Par 16).

Das cinco crianças EGM-negativo (Pares 3, 7, 11, 13 e 15), três (Pares 3, 7 e 11) não tinham experiência de cárie, sendo que a menina do Par 7 não tem glândulas salivares e sua mãe tinha CPOD = 16. A menina EGM negativo do Par 13 tinha alto índice de cárie (ceo=13). As mães dos pares 3, 7, 11 e 13 têm

colonização de *Streptococcus mutans* abaixo de 10^5 ufc/mL e alta prevalência de cárie (CPOD = 17, 16, 12 e 19, respectivamente).

Das crianças com Síndrome de Down avaliadas, sete crianças eram do gênero masculino e nove do gênero feminino, sendo que quatro meninos e seis meninas não tinham experiência de cárie. Duas das crianças do gênero masculino eram EGM-negativo e sem cárie. Duas meninas sem experiência de cárie apresentavam níveis menores que 10^5 ufc/mL sendo colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. As outras albergavam apenas *Streptococcus mutans*, sendo duas meninas com $3,1 \times 10^3$ ufc/mL e uma com 10^6 ufc/mL.

Tabela 2. Distribuição dos 16 pares mãe-filho com Síndrome de Down de acordo com a idade, contagem de colônias de EGM (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*), bacteriocinotipagem dos isolados, prevalência de cárie (ceo e CPOD) e gênero.

PARES	Nome	Idade	EGM	Contagem (ufc/mL)	Bacteriocina	ceo / CPOD
1	D.A.D.M.	40 anos*	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	$6,0 \times 10^3$ 10^3	1 3	17
	G.M.S. ♂	8 anos e 1 mês	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	10^4 $7,5 \times 10^2$	1 2	4
2	D.R.J.	42 anos*	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	$5,0 \times 10^3$ $7,0 \times 10^2$	2 3	26
	V.R.S. ♀	3 anos e 6 meses	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	$1,7 \times 10^3$ $3,5 \times 10^2$	0 0	0
3	M.R.Q.	20 anos*	<i>S mutans</i>	$8,8 \times 10^3$	1	17
	A.P.Q. ♂	12 anos	Negativo			0
4	D.M.A.	33 anos*	<i>S mutans</i>	$3,7 \times 10^3$	6	22
	V.A.V. ♂	2 anos e 8 meses	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	10^6 $5,0 \times 10^2$	1 4	0
5	M.B.C.R.C.	39 anos*	<i>S mutans</i>	10^6	2	23
	G.C.R.B.C. ♂	2 anos e 1 mês	<i>S mutans</i>	10^2	5	0
6	I.A.C.	24 anos*	<i>S mutans</i>	$1,5 \times 10^3$	2	9
	I.N.C. ♀	10 meses	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	10^2 $5,0 \times 10^2$	2 0	0
7	V.M.F.B.	33 anos*	<i>S mutans</i>	$1,5 \times 10^2$	4	16
	L.T.B. ♀	3 anos e 6 meses	Negativo			0
8	E.P.S.	31 anos*	<i>S mutans</i>	10^6	6	21
	J.B.P. ♀	2 anos	<i>S mutans</i>	$3,1 \times 10^3$	2	0
9	C.A.A.	25 anos*	Negativo			25
	I.G.A.P. ♀	2 anos	<i>S mutans</i>	10^6	1	0
10	L.M.N.S.	28 anos*	<i>S mutans</i>	10^6	1	18
	G.M.S. ♀	6 anos e 6 meses	<i>S mutans</i>	10^6	2	4
11	I.R.A.O.	40 anos*	<i>S mutans</i>	$3,1 \times 10^3$	0	12
	A.A.O. ♂	10 meses	Negativo			0
12	A.G.A.C.	17 anos*	<i>S mutans</i>	$2,5 \times 10^3$	4	20
	I.L.G. ♀	11 anos	<i>S mutans</i>	$3,0 \times 10^3$	5	0
13	W.V.S.S.C.	40 anos*	<i>S mutans</i>	$1,6 \times 10^3$	1	19
	I.C.S.C. ♀	3 anos e 9 meses	Negativo			13
14	D.S.L.	56 anos (avó) 16 anos* (mãe)	<i>S mutans</i>	10^6	1	27
	B.E.O. ♀	12 anos	<i>S mutans</i>	$3,4 \times 10^3$	1	4
15	M.M.A.	37 anos*	Negativo			14
	V.G.M.A. ♂	5 anos e 6 meses	Negativo			4
16	V.C.S.A.	23 anos*	Negativo			22
	R.L.S.A. ♂	5 anos e 6 meses	<i>S mutans</i>	10^6	2	17

Legenda: *: idade da mãe ao nascimento da criança; ♂ : gênero masculino ; ♀: gênero feminino; ceo: índice de cárie em dentes decíduos, onde "c" = cariado; "e" = extração indicada e "o" = obturado; índice de cárie em dentes permanentes, onde "C" = cariado; "P" = perdido; "O" = obturado e "D" = dente. Cor vermelha: pares com bacteriocinotipos semelhantes.

A Tabela 3 mostra a distribuição das 16 crianças com SD de acordo com a faixa etária e colonização de EGM: duas crianças na faixa etária de até um ano, sendo que uma delas com níveis não detectáveis; nove crianças na faixa etária de 2 – 5 anos e três com níveis não detectáveis. As duas crianças na faixa etária de 6 – 8 anos estavam infectadas. Apenas uma das três crianças na faixa etária de 9 – 12 anos albergava EGM.

Tabela 3. Distribuição dos 16 crianças com SD com a faixa etária e colonização de EGM.

Faixa etária (anos)	Nº de Crianças SD	EGM	
		(+)	(-)
até 1	2	1	1
2 – 5	9	6	3
6 – 8	2	2	0
9 – 12	3	1	2
TOTAL	16	10	6

Presença de EGM: (+); Não detecção de EGM: (-)

A Figura 1 mostra o gel após eletroforese com os perfis de DNA de *Streptococcus mutans* obtidos após digestão pela enzima Hae III. Os isolados de pares mãe-filho foram denominados como: Par 1, Gel II e III; Par 6, Gel IV e V; Par 14, Gel VI e VII. Não foi possível extração cromossomal do isolado de *Streptococcus mutans* do menino pertencente ao Par 1. No Par 6 ocorreu identidade entre os genótipos de *Streptococcus mutans* da menina SD de dez meses de idade (também colonizada por *Streptococcus sobrinus*) e sua progenitora (monocolonizada por *Streptococcus mutans*). No Par 14 a similaridade das cepas é bastante evidente. A menina de 12 anos de idade do Par 14 foi criada pela avó materna, pois a mãe ao nascimento da criança era bastante jovem (16 anos de idade), não mantendo contato próximo com a filha.

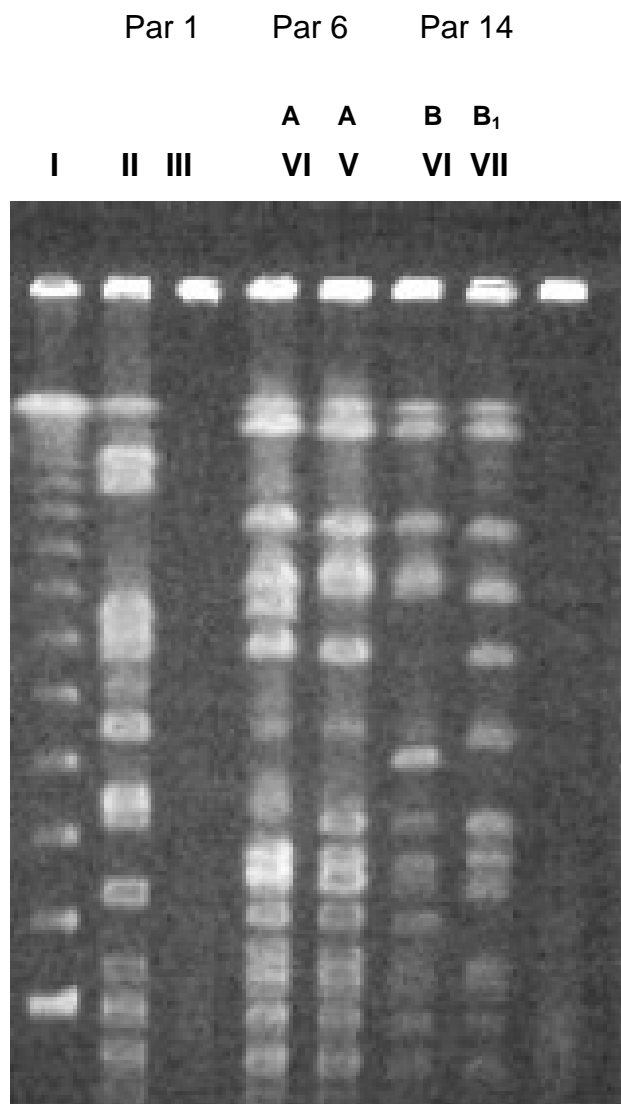


Figura 1.

Legenda do gel: I = Marcação de peso molecular com *Lambda* (Hae III) como restrição de fragmento padrão.

PARES	GEL	Nome	EGM	Bacteriocina	RFLP
1	II	D.A.D.M.	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	1 3	
	III	G.M.S.	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	1 2	
6	IV	I.A.C.	<i>S mutans</i>	2	A
	V	I.N.C.	<i>S mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	2 0	A
14	VI	D.S.L. (avó)	<i>S mutans</i>	1	B
	VII	B.E.O.	<i>S mutans</i>	1	B1

Tabela 4. Distribuição das mães EGM negativo e nível de *Streptococcus mutans* das crianças de acordo com a idade.

MÃES (3) EGM NEGATIVO	
Idade das crianças	Nível de <i>S. mutans</i> (ufc/mL) das crianças
2 anos	10⁶
5anos e 6 meses	NEGATIVO
5anos e 6 meses	10⁶

A Tabela 5 mostra a distribuição das cinco crianças com SD EGM-negativo e colonização de suas mães. Três crianças abaixo de quatro anos de idade têm níveis de EGM inferiores a 10⁵ ufc/mL *Streptococcus mutans*. Um menino de cinco anos de idade EGM-negativo tem mãe com níveis não detectáveis destes microrganismos, apesar do pai apresentar todos os dentes permanentes com necessidades de tratamento odontológico não atendidas. Duas meninas de três anos e seis meses e três anos e nove meses de idade, apresentam colonização de *Streptococcus mutans* semelhante, no entanto uma delas tem agenesia de glândulas salivares, fazendo uso diário e freqüente de saliva artificial. A mãe do menino de 12 anos de idade apresenta colonização de *Streptococcus mutans* expressiva para o grupo estudado (8,8x10³ ufc/mL).

Tabela 5 . Distribuição das crianças com SD EGM negativo e nível de *Streptococcus mutans* das mães.

CRIANÇAS (5) EGM NEGATIVO	
Idade	Mães
(<i>Streptococcus mutans</i> / ufc/mL)	
10 meses	3,1 x 10³
5 anos	negativo
3 anos e 6 meses	1,5 x 10²
3 anos e 9 meses	1,6 x 10³
12 anos	8,8 x 10³

A Tabela 6 mostra as crianças por idade, relacionado-as com o nível de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e com o nível de EGM de suas mães. Nenhum indivíduo dos pares mãe-filho apresentou moderada (10^5 - 10^6 ufc/mL) colonização de *Streptococcus mutans*. Quatro crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e apenas duas mães albergavam as duas espécies. Os dois meninos de cinco anos apresentaram níveis de colonização contrastantes: um EGM-negativo e outro com nível 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans*.

Tabela 6. Distribuição das 16 crianças com SD e suas mães de acordo com a idade e contagem de colônias de EGM.

CRIANÇAS		EGM		CRIANÇAS									MÃES		
Idade (anos)	N ^o	+	-	EGM (ufc/mL)											
				<i>S.mutans</i>			<i>S.sobrinus</i>			<i>S.mutans</i>			<i>S.sobrinus</i>		
				< 10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	>10 ⁶	< 10	10 ⁵ -10 ⁶	>10 ⁶	< 10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	>10 ⁶	< 10	10 ⁵ -10 ⁶	>10 ⁶
< 1	2	1	1	1			1			2					
2	4	4	0	2		2	1		1	1		2			
3	3	1	2	1			1			3			1		
4	0														
5	2	1	1			1									
6	1	1	0			1						1			
7	0														
8	1	1	0	1			1			1			1		
9	0														
10	0														
11	1	1	0	1						1					
12	2	1	1	1						1		1			
Total	16	11	5	7		4	4			9		4	2		

A Tabela 7 mostra a distribuição das 16 crianças com SD de acordo com os níveis de EGM e risco de cárie: 12 crianças com SD apresentavam baixo risco de cárie com relação a contagem de EGM. Quatro delas tinham níveis de EGM iguais a 10^6 ufc/mL. Dessas, duas meninas e dois meninos, sendo duas crianças na faixa etária de seis a oito anos (uma de cada gênero) e duas na faixa etária de dois a cinco anos de idade (uma de cada gênero).

Tabela 7. Distribuição das mães e crianças com SD de acordo com nível de EGM e risco de cárie

Níveis de EGM (ufc/mL)	Crianças	Mães	Risco á cárie
zero	5	3	baixo
< 10^5	7	9	baixo
= 10^6	4	4	alto
Total	16	16	

6. Discussão

Os resultados mostraram um CPOD alto das mães e ceo baixo dos filhos com SD. A mãe do Par 9 apesar de ter apresentado EGM-negativo tinha CPOD = 25, mas todos os dentes tratados e sua filha não tinha experiência de cárie aos dois anos de idade mesmo com contagem de 10^6 ufc/mL. Em crianças sem SD a maioria dos autores relaciona o nível elevado (acima de 10^5 ufc/mL) de *Streptococcus mutans* com o desenvolvimento de cárie (Klock & Krasse, 1977; Loesche et al., 1984; Buischi et al., 1987; Alaluusa et al., 1989; Höfling, 1992; Dasanayake et al., 1995; Gavazzi et al., 1995; Alves & Medeiros, 1997; Mattos-Graner et al., 1998; Angulo et al., 1999; Twetman et al., 1999; Campus et al., 2000). Stabholz et al., 1991 estudando crianças com trissomia 21 de três a oito anos de idade correlacionaram positivamente prevalência de cárie a contagem de EGM e Schimidt, 1995 investigando níveis de EGM em adolescentes com SD, encontraram a maioria deles com alta e moderada colonização por EGM relacionando-se ao escore de cárie.

Neste estudo, sete crianças eram do gênero masculino e nove do gênero feminino. Quatro meninos e seis meninas não tinham experiência de cárie. Duas crianças do gênero masculino sem cárie eram EGM-negativo e das meninas sem cárie, apenas uma era EGM-negativo. O estudo de Alaluusa et al., 1989 mostrou níveis não detectáveis de *Streptococcus mutans* em crianças sem SD com ceo menor que 0,9. Gavazzi et al., 1995 encontraram em 356 crianças brasileiras sem SD na faixa etária de seis a oito anos, ceo = 4,94 em média e colonização de *Streptococcus mutans* de $2,24 \times 10^5$ ufc/mL, sendo que a avaliação longitudinal de dois anos mostrou incremento de cárie relacionando-se positivamente com a colonização de EGM e experiência passada de cárie. Thibodeau & O'Sullivan, 1996 estudaram 146 crianças americanas sem SD (idade média de 3,8 anos) durante dois anos. As que tinham moderada e alta contagem (acima de 10^5 ufc/mL) de EGM

apresentaram duas vezes mais cárie que as de baixa contagem (menos de 10^5 ufc/mL).

Nos resultados sete estudo, duas mães EGM-negativo tinham dois meninos com cinco anos de idade, sendo que um (Par 15) era também EGM negativo e ceo = 4. O outro, do Par 16, tinha 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans* e ceo = 17. Ambas as crianças tinham cárie não tratada. Em crianças não síndrômicas, Dasanayake et al., 1995, avaliando 353 afro-americanos de cinco a 12 anos de idade não encontraram associação entre níveis de EGM e porcentagem de dentes tratados e Toi et al., 1999 encontraram 60% de 140 crianças sul-africanas (cinco anos de idade) com cárie não tratada correlacionadas positivamente com a contagem de EGM.

Das 16 crianças com SD, nossos resultados mostraram: duas na faixa etária de até um ano de idade, sendo uma delas com níveis não detectáveis de EGM; nove crianças na faixa etária de 2 – 5 anos e três com níveis não detectáveis; as duas crianças na faixa etária de 6 – 8 anos estavam colonizadas e uma das três crianças na faixa etária de 9 –12 anos albergava EGM. As duas crianças na faixa etária de 6 – 8 anos que estavam infectadas, coincidem com o período de irrompimento de primeiros molares decíduos e incisivos anteriores permanentes. Segundo Brown & Cunningham (1961); Jensen et al. (1973); Jara et al. (1993); Ondarza et al. (1995) e Ferreira et al.(1998) pacientes com SD podem ter atraso de irrompimento dental, posterior à época de crianças não síndrômicas. Condições propícias à "Janela de Infectividade", descrita por Caufield et al., 1993 que estariam presentes facilitando a colonização dos EGM.

Doze crianças com SD apresentavam baixo risco de cárie com relação a níveis de EGM e quatro delas, alto risco com níveis de EGM iguais a 10^6 ufc/mL. Dessas quatro, duas crianças na faixa etária de seis a oito anos estão na "janela de infectividade" e duas na faixa etária de dois a cinco anos. Araújo, 2000 estudando a prevalência de cárie em 42 crianças brasileiras com SD de até 60 meses de idade,

encontrou 26 delas livres de cárie. Apenas 15% das crianças examinadas nunca haviam recebido atenção odontológica. Investigando 40 crianças com SD na mesma faixa etária deste estudo, encontramos em pesquisa anterior (Campos, 2001), 16 delas com níveis não detectáveis de EGM, sendo que maioria tinha baixos níveis de colonização e apenas uma com 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans*. Marinho de Jesus, 2002 estudando 26 crianças com SD com idade média de 24 meses, encontrou a metade delas com níveis não detectáveis de EGM.

Straetemans et al., 1998 comentaram que crianças sem SD colonizadas antes dos cinco anos de idade tinham aos 11 anos maior número de EGM do que as colonizadas após os cinco anos de idade. Mattos-Graner et al., 1998 afirmaram que os níveis salivares de EGM são dependentes do número de dentes irrompidos na cavidade bucal. As crianças com SD têm atraso no irrompimento dental e podem ter também ausências dentárias em maior número que a população não síndrômica (Cohen & Winer, 1965; Creighton & Wells, 1966; Orner, 1975; Loiseau & Nardoux, 1976; Barnett et al., 1986; Le Clech et al., 1986; Vigild, 1986; Crespo, 1987; Chan, 1994). Köhler et al., 1983 comentaram que crianças sem SD quando ficavam mais velhas eram expostas a outras fontes de *Streptococcus mutans* e mudanças de hábitos, além de terem maior número de dentes irrompidos, o que aumentava as chances de contaminação por EGM. Sanz et al., 1989 afirmaram que a prevalência de cárie em indivíduos com SD aumenta com a idade e Marinho de Jesus, 2002 que a colonização de EGM em crianças com SD também aumenta com a idade.

A maioria dos autores considera a prevalência de cárie nos pacientes com SD, independente de sua idade, quando comparada a de grupos controle como sendo menor (Cohen & Winer, 1965; Creighton & Wells, 1966; Wolf, 1967; Cutress, 1971; Jensen et al., 1973; Orner, 1975; Loiseau & Nardoux, 1976; Barnett et al., 1986; Le Clech et al., 1986; Vigild, 1986; Shapira et al., 1991; Stabholz et al., 1991; Araújo, 2000). Entretanto diferença significativa não foi encontrada na prevalência de cárie em paciente com SD pelos seguintes autores: Kroll et al., 1970; Gullikson,

1973; Steinberg & Zimmerman, 1978 e Yarat et al., 1999. Apenas Bianchi et al., 1991 constataram uma prevalência maior, sendo que Morinushi et al., 1995 consideraram a severidade de cárie em indivíduos com SD como sendo bipolar: indivíduos sem cárie e os com envolvimento severo.

No presente estudo, dos seis pacientes com cárie, quatro tinham ceo = 4 e dois tinham alta prevalência, sendo um com ceo = 13 e outro com ceo = 17. Dez crianças não tinham experiência de cárie.

Borea et al. 1990 e Bianchi et al., 1991 não encontraram correlação entre a higiene bucal e cárie nos pacientes com SD. Brown & Cunningham, 1961 e Bigeard et al., 1990 concordaram que este fato não é relevante em relação à prevalência da cárie nos mesmos. Os pacientes com SD apresentam déficit intelectual e dificuldades motoras o que dificulta a instituição de adequados hábitos de higienização. No entanto, os dados encontrados nesta pesquisa com a maioria das 16 crianças com SD mostraram nível de colonização por EGM e prevalência de cárie baixos, sendo que a higiene bucal das crianças era satisfatória.

Cutress, 1971 analisando 416 pacientes neozelandeses com SD de cinco a 24 anos de idade, verificou que os pacientes institucionalizados tinham menores índices de cárie dos que viviam com a família. Comparando 212 pacientes com SD (100 institucionalizados) com idades de cinco a 20 anos, Orner, 1975 constatou que a experiência de cárie dos mesmos era um terço menor que a de seus irmãos. Vigild, 1986 encontrou dados semelhantes em 56 pacientes dinamarqueses com SD, sendo a metade deles livres de cárie independente se viviam ou não com a família. Allison & Lawrence, 2004 em 938 pares de família compararam pacientes com SD com seus irmãos com idades variando até 18 anos. Os resultados mostraram-se semelhantes quanto aos indicadores de cuidados dentais em ambos os grupos. Dependendo da faixa etária, cuidados diferenciados eram dispensados às crianças com SD quando comparadas a seus irmãos. A maior diferença foi quanto a

época da primeira consulta e tratamento odontológico, mais cedo em pacientes com SD.

Fatores genéticos poderiam ser responsáveis pela menor prevalência de lesões cariosas nos pacientes com SD, refletindo a expressão da trissomia do cromossomo 21 que afetaria a resposta à cárie (Orner,1975; Shapira et al.,1991). A saliva de pacientes com SD apresenta altos níveis de pH, sódio, cálcio, bicarbonato e fósforo (Winer et al.,1965; Winer & Feller,1972). A colonização de EGM depende do tamanho do inóculo bacteriano, aderência microbiana e variáveis do hospedeiro (Korenstein et al., 1995). A produção de bacteriocinas interfere na colonização de bactérias por antagonismo seletivo, tendo um importante papel na colonização de determinada cepa pioneira. Campos, 2001 e Marinho de Jesus, 2002 encontraram menor prevalência de *Streptococcus mutans* nos pacientes com SD, semelhante ao que foi constatado nos 16 pacientes da presente investigação.

Thibodeau & O'Sullivan, 1999 afirmaram que avaliações anuais dos níveis de EGM permitem identificar risco de cárie na dentição decídua e mista. Examinando 83 crianças não síndrômicas afro-americanas e descendentes de hispânicos com idade média de 3,8 anos durante seis anos, verificaram que a maioria delas estava colonizada e foram mais suscetíveis à cárie, sendo que em 16 não foi possível detectar EGM.

Nenhum indivíduo dos pares mãe-filho apresentou moderada (10^5 - 10^6 ufc/mL) colonização de *Streptococcus mutans*. Quatro crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e apenas duas mães albergavam as duas espécies. Das 16 crianças com SD, sete estavam colonizadas por *Streptococcus mutans* com níveis menores que 10^5 ufc/mL. Quatro crianças apresentavam 10^6 ufc/mL de *Streptococcus mutans* e em cinco não foi possível a detecção de EGM. Nove mães tinham níveis menores que 10^5 ufc/mL de *Streptococcus mutans* e duas delas albergavam também *Streptococcus sobrinus*.

Quatro mães com *Streptococcus mutans* com níveis de 10^6 ufc/mL, não sendo possível a detecção de EGM em outras três.

Das quatro crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, uma delas que carregava alta contagem de *Streptococcus mutans* (10^6 ufc/mL), no entanto não tinha cárie. Nos Pares 4 e 6 as crianças SD eram colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e suas progenitoras apenas por *Streptococcus mutans*. Das quatro crianças do nosso estudo colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, uma tinha ceo = 4 e as outras três sem cárie. Na investigação de Barone et al., 2005 não foram detectadas crianças com SD carregando *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

Okada et al., 2002 analisaram a colonização de EGM em 77 crianças japonesas não sindrômicas em idade pré-escolar (três a cinco anos de idade) sem SD e encontraram 72,8% colonizadas por *Streptococcus mutans* e 61,1% por *Streptococcus sobrinus*. Dezenove delas (24,7%) albergavam apenas *Streptococcus mutans* e dez (13%) apenas *Streptococcus sobrinus*. A colonização por ambas as espécies foi detectada em 37 (48,1%) das crianças e 11 (14,3%) eram negativas para EGM. Os índices de prevalência de cárie eram mais altos quando ambas as espécies estavam presentes, quando comparados com a colonização de apenas *Streptococcus mutans*.

Lindquist & Emilsson, 2004 estudando *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e a prevalência de cárie com relação a esta colonização em crianças sem Síndrome de Down, cujas mães albergavam ambas as espécies encontrou que a maioria das crianças (10/15) adquiriu EGM durante o período do estudo (sete anos). No entanto apenas quatro delas tinham *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* apesar das todas as mães terem ambos os genótipos. Em duas crianças, *Streptococcus sobrinus* foi detectado posteriormente a *Streptococcus mutans*. Num total de 26 genótipos caracterizados, nove eram idênticos aos de suas

mães. Novas cepas foram notadas especialmente em crianças, mas também sem suas mães. A incidência de cárie foi baixa enquanto durou a pesquisa, sendo que oito crianças não tiveram a doença

Okada et al., 2005 em estudo de um ano com 60 pré-escolares não sindrômicos (três a cinco anos de idade) compararam a incidência de cárie com a colonização por EGM. A prevalência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* encontrada foi de 61,7% e 56,6%, respectivamente. Em 13 (21,7%) crianças albergavam apenas *Streptococcus mutans*, 10 (16,6%) apenas *Streptococcus sobrinus* e 24 (40%) eram colonizados por ambas as espécies. Entretanto não foi possível a detecção de EGM em 13 (21,7%). Crianças colonizadas por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* tinham maiores índices de prevalência de cárie do que as colonizadas apenas por *Streptococcus mutans* ($p < 0,05\%$).

O nosso estudo mostrou resultados diferentes dos encontrados por Okada et al. (2002) e Okada et al. (2005) e semelhantes aos de Lindquist & Emilsson (2004) quanto a colonização de ambas as espécies de EGM e prevalência de cárie. A maioria crianças com SD do presente estudo que apresentavam colonização por *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* tinham índice de prevalência de cárie baixo ou não tinham experiência da doença.

Splieth & Bernhartt, 1999 afirmaram que existe associação entre baixa contagem de EGM e baixa incidência de cárie após investigarem 230 crianças não sindrômicas de seis a sete anos de idade. A presença ou não de EGM não pode ser tomada como único determinante da cárie, pois ela pode desenvolver-se em indivíduos com níveis não detectáveis (Loesche & Strafon, 1979; Buischi et al., 1987; Alves & Medeiros, 1997).

Três pares (1, 6 e 14) mãe e criança com SD do presente estudo, albergavam bacteriocinotipos similares, sendo que dois deles tinham o mesmo

genótipo. A menina de 12 anos de idade do Par 14 foi criada pela avó materna, pois a mãe ao nascimento da criança era bastante jovem (16 anos de idade), não mantendo contato próximo com a filha. A cepa de *Streptococcus mutans* era a mesma, sendo que o cromossomo similar apresentava pequena variação (B e B₁). Barone et al., 2005 não encontraram nenhuma criança com SD compartilhando o mesmo genótipo de *Streptococcus mutans* com suas progenitoras.

O fato da menina SD do Par 14 de 12 anos de idade ter a mesma cepa de *Streptococcus mutans* da avó materna não causa estranheza já que ambas tinham contato íntimo e freqüente. Davey & Rogers, 1984 consideram importante o contato freqüente entre os indivíduos sem SD na transmissão de microrganismos bucais entre os indivíduos. Caufield & Walker, 1989 evidenciam a estabilidade de cepas entre pares de mães e filhos não síndrômicos em seguimento de três anos. Wan et al., 2003 observaram que a colonização de EGM associa-se positivamente à contatos próximos, íntimos e constantes entre crianças e adultos como compartilhar comidas, utensílios e dormir com a mãe. Li et al., 2005 destacaram que eventos perinatais como peso do bebê, tipo de parto e aleitamento, idade, escolaridade da mãe e nível socioeconômico da família influenciam na colonização de *Streptococcus mutans* de crianças sem SD.

Dasanayake et al., 1995 destacaram a importância de hábitos alimentares como consumo freqüente de alimentos açucarados na colonização e estabelecimento de EGM em crianças não síndrômicas. Thorild et al., 2002 acrescentaram a isto o papel relevante da história médica e hábitos de higiene bucal. Não encontramos estudos que correlacionassem estes fatores a colonização de EGM em crianças com SD. No entanto, Allison & Lawrence, 2004 ressaltaram que dependendo da idade, crianças com Síndrome de Down recebiam atenção diferenciada, sendo levados ao dentista mais cedo que seus irmãos não síndrômicos.

Caufield & Walker, 1989 consideraram a determinação do perfil de restrição enzimática do DNA (RLFP) como um método seguro para pesquisa e

análise do DNA cromossomal de *Streptococcus mutans*. Não foi possível extração de material genético do isolado de *Streptococcus mutans* do menino do Par I.

Novas cepas de EGM são adquiridas por todos os membros das famílias com o passar do tempo, novos contatos e exposição a diferentes fontes de microrganismos (Emanuelsson & Thornqvist, 2000; Lindquist & Emilsson, 2000; Klein et al., 2004)

Dentro de um mesmo grupo familiar, a mãe é provavelmente o principal reservatório de EGM na transmissão destes microrganismos para sua prole (Jordan et al., 1972; Berkowitz & Jordan, 1975; Berkowitz et al., 1975; Edwardsson & Mejare, 1978; Berkowitz & Jones, 1985; Caufield et al., 1988; Caufield & Walker, 1989; Kulkarni et al., 1989; Li & Caufield, 1995; Grönroos et al., 1998; Van Loveren et al., 1999; Li et al., 2000; Van Loveren et al., 1999; Klein et al., 2004; Lindquist & Emilsson, 2004; Li et al., 2005), sendo que existe uma correlação nas contagens salivares entre pares mãe-filho e conseqüentemente, maior risco e maior experiência de cárie nos casos de colonização materna em níveis elevados de estreptococos bucais (Köhler & Bratthal, 1978; Berkowitz et al., 1980; Köhler et al., 1983; Köhler & Andreén, 1994; De Soet et al., 1998; Emanuelsson et al., 1998). A implantação destes microrganismos relaciona-se com o número de dentes irrompidos na cavidade bucal e quantidade do inóculo bacteriano (Davey & Rogers, 1984). A condição de saúde bucal e nível de colonização de EGM das mães influenciam a transmissão precoce destes microrganismos aos seus filhos (Berkowitz, 1975; Köhler & Bratthal, 1978; Rogers, 1981; Van Houte et al., 1981; Berkowitz & Jones, 1985; Li & Caufield, 1995; Straetemans et al., 1998; Torres et al., 1999). Aaltonen & Tenovu, 1994 acompanhando crianças de sete meses de idades por um período de até sete anos após, não correlacionaram a freqüente transferência salivar materna para a boca de bebês antes do irrompimento dos dentes com o nível de colonização e experiência de cárie na dentição decídua. Atribuíram isto a mecanismos de proteção imunológica aumentando a resistência das crianças. Guimarães et al., 2004 não encontraram correlação significativa entre colonização de *Streptococcus mutans* e idade de

crianças sem SD e atividade de cárie. No entanto encontraram associação entre atividade de cárie nas mães e seus filhos.

Rogers, 1981 analisando a colonização de EGM em 28 famílias através de bacteriocinotipagem, constatou indivíduos com um único padrão de mutacinas em dois membros no mínimo, sendo sempre em um dos pais. Emanuelsson & Wang, 1998 trabalhando com crianças chinesas encontraram padrão de transmissão familiar diferente de famílias ocidentais, sendo que os filhos também albergavam cepas paternas. Os estudos de transmissão intrafamiliar apontam a fidelidade de cepas na transmissão de EGM entre mães e filhos sem SD, sugerindo a transmissão vertical desde a mais tenra idade, não excluindo no entanto discretos indicadores entre outros membros da família e outras pessoas que tenham uma convivência por longos períodos (Köhler & Bratthall, 1978; Li & Caufield, 1985; Kulkarni et al., 1989; Caufield, 1993; Azevedo et al., 1998; Emanuelsson & Thornqvist, 2001; Mattos-Graner et al., 2001; Pimenta, 2001; Köhler et al., 2003; Spolidorio et al., 2003; Amoroso et al., 2004). Alguns trabalhos têm alertado para a influência cultural, hábitos comportamentais e nível socioeconômico na colonização dos *Streptococcus mutans* (Beighton et al., 2004).

Os estudos epidemiológicos da cárie abrangem a identificação e diferenciação de microrganismos bucais e suas características de colonização que são determinantes na instalação e manutenção do processo cariogênico. Vários métodos são utilizados na determinação das espécies da cavidade bucal tais como os bioquímicos, imunológicos e genéticos, sendo que muitas técnicas são utilizadas conjuntamente para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. É necessário atentar-se para a obtenção de métodos sensíveis, simples e viáveis economicamente que revertam em práticas clínicas que modifiquem situações desfavoráveis à saúde bucal da população.

Azevedo et al., 1998 ressaltaram que a análise qualitativa e quantitativa de EGM, em nível de espécie pode servir como critério para selecionar medidas de prevenção, tornando viável a relação custo versus eficiência dos tratamentos preventivos. Zero (1999) considera que fatores genéticos, biológicos, sociais e componentes psicológicos interagem num complexo sistema determinando o aparecimento da cárie. A prevenção e controle da cárie dependem do conhecimento da colonização de microrganismos bucais, em especial de EGM, através da identificação das fontes e modo de transmissão entre os hospedeiros (Amoroso et al., 2004).

Li et al., 2003 demonstraram preocupação com novas pesquisas sobre colonização de EGM em outros grupos populacionais como minorias étnicas pois a dinâmica da microbiota humana é variada, dependendo de vários fatores socioeconômicos e culturais. Entendemos que estas observações são importantes para estudos de colonização de EGM em grupos que tenham condições especiais de vida e no entanto são saudáveis. Ainda existem dúvidas sobre a transmissão intrafamiliar de EGM em pacientes com SD que devem ser melhor analisadas.

7. Conclusões

- ✓ A maioria das mães tinha CPOD alto e maioria das crianças com Síndrome de Down tinha ceo baixo.
- ✓ A maioria das Crianças com Síndrome de Down (12/16) apresentaram baixo risco de cárie de acordo com os níveis de EGM (cinco EGM negativo e sete com níveis menores que 10^6 ufc/mL).
- ✓ Três pares mãe-filho com SD (Pares 1, 6 e 14) apresentaram bacteriocinotipos similares de *Streptococcus mutans*.
- ✓ Destes, um par (Par 6) apresentou identidade de genótipos e o outro (Par 14) apresentou similaridade de genótipos.
- ✓ A transmissão vertical de EGM ocorreu pares de mães e crianças com SD.

Referências Bibliográficas

AALTONEN, A.S.; TENOVUO, J. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. **Pediatr. Dent.**, 16 (2):110-116, 1994.

AGUIAR, S.A.; SANTOS-PINTO, R.; PACCA, C.A.A.; COELHO FILHO, H.C. Análise comparativa do percentual de cárie dental entre paciente portadores de Síndrome de Down e de retardo mental por lesão anóxica cerebral. **Rev. Odontol. UNESP**, 21 (1), 359-368, 1992.

ALALUUSA, S.; MYLLÄRNIEMI, S.; KALLIO, M. *Streptococcus mutans* infection level and caries in a group of 5-year-old children. **Caries Res.** 23:190-194, 1989.

ALLISON, P.J.; LAWRENCE, H.P. A paired comparison of dental care in Canadians with Down syndrome and their siblings without syndrome. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, 32 (2): 99-106, 2004.

ALVES, A.C.; MEDEIROS, U.V. Níveis salivares de estreptococos do grupo mutans e frequência de lesões de manchas brancas em crianças. **Rev. ABO Nac**, 5 (4): 245-250, 1997.

AMOROSO, P.; FRANCO e FRANCO, T.C.C.; MARIN, J. M.; ÁVILA, F.A. Avaliação comparativa da PCR e fenotipagem na detecção de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* e estudo da transmissão. **Cienc. Odontol. Bras.**, 7(2): 30-40, 2004.

ANGULO, M.; CABANAS, B.; CAMPOREALE, N.; EMILSON, C-G. Dental caries and caries-associated microorganisms in Uruguayan preschool children. **Acta Odontol. Scand**, 57: 301-305, 1999.

ARAÚJO, N.C.B.I. Prevalência de cárie dentária em crianças portadoras de Síndrome de Down na faixa etária de 0 a 60 meses. **JBP**, 3(12): 147-157, 2000.

AZEVEDO, R.V.P. Emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do “grupo mutans”. São Paulo, 110 p. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas - USP. 1988.

AZEVEDO, R.V.P.; FREITAS, A. C.; ASSED, S.; SILVA, L.A.B.; NELSON FILHO, P.; ITO, I.Y. Estreptococos do grupo mutans: determinação do risco a cárie e da prevalência das espécies na saliva de crianças – método da espátula. **Revista de Odontopediatria**, 2 (2): 91- 96, 1993.

AZEVEDO, R.V.P.; NELSON FILHO, P.; ASSED, S.; ITO, I.Y. Estreptococos do grupo mutans: isolamento, identificação e prevalência das espécies na saliva de pares mãe/filho. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, 12(1): 47-50, 1998.

AZEVEDO, R.V.P.; ZELANTE, F.; ITO, I.Y. Detecção de cepas de *Streptococcus mutans* produtoras de substâncias semelhantes a bacteriocina (mutacina). **Rev. Fac. Odontol. Ribeirão Preto**, 22: 69-74, 1985.

BACA, P.; LIÉBANA, J.; PIEDROLA, G. Epidemiological application of a new bacteriocin typing scheme for *Streptococcus mutans*. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v.18, p. 194-196, 1990.

BARAITSER, M.; WINTER, R. **Color Atlas of Congenital Malformation Syndromes**, London: Mosby-Wolfe, 1996. p. 1-2.

BARONE, S.; MACEDO, C.; MARIN, J.M. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. **Spec. Care. Dent.**, 25 (1): 37-42, 2005

BARNET, M.L.; PRESS, K.P.; FRIEDMAN, D.; SONNENBERG, E.M. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. **J. Periodontol.**, 57 (5): 288-293, 1986.

BEIGHTON, D.; BRAILSFORD, S.; SAMARANAYAKE, L.P.; BROWN, J.P.; PING, F.X.; GRANT-MILLS, D.; HARRIS, R.; LO, E.C.M.; NAIDOO, S.; RAMOS-GOMEZ, F.; SOO, T.C.; BURNSIDE, G.; PINE, C.M. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. **Comm. Dent. Health**, 21 (Supplement): 96-101, 2004.

BEIGHTON, D.; HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. A scheme for the identification of viridans streptococci. **J. Med. Microbiol.**, 35: 367-372, 1991 ^a.

BEIGHTON, D.; RUSSEL, R. R. B.; WHILEY, R.A. ^b A Simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* . **Caries Res.**, 25: 174-78, 1991.

BERKOWITZ, R.J.; JONES, P. Mouth-to-mouth transmission of the bacterium *Streptococcus mutans* between mother and child. **Archs. Oral Biol.**, 30 (4): 377-379, 1985.

BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. **Archs. Oral Biol.**, 20: 1-6, 1975.

BERKOWITZ, R.J.; JORDAN, H.V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouth of infants. **Archs. Oral Biol.**, 20: 171-174, 1975.

BERKOWITZ, R.J.; TURNER, J.; GREEN, P. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. **Archs. Oral Biol.**, 25 (4): 221-224, 1980.

BERKOWITZ, R.J; TURNER, J.; GREEN, P. Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. **Archs. Oral Biol.**, 26 (2): 147-149, 1981.

BIANCHI, A.M.; CUEVAS, A.; JARAMILLO, R.J. Investigación odontológica en personas con síndrome de Down: reflexiones y síntesis. **Rev. Asoc. Odontol. Argent.**, 79 (3): 146-152, 1991.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos. 1985. p. 944.

BIGEARD, L.; SOMMERMATER, J.; JUIF, J. Bilan buco-dentaire dans diverses situations pathologiques chez l'enfant. **Actual Odontostomatol.**, 44 (169):141-152, 1990.

BOREA, G.; MAGI, M.; MINGARELLI, R.; ZAMBONI, C. The oral cavity in Down síndrome. **Journal of Pedodontics**, 14 (3):139-140, 1990.

BRATTHAL, D.; HOSZEK, A.; ZHAO, X. Evaluation of a simplified method for site-specific determination of mutans streptococci levels. **Swed. Dent. J.**, 20: 215-220, 1996.

BROWN, R.H.; CUNNINGHAM, W.M. Some oral manifestations of mongolism. **O.S., O.M. & O.P.**, 14 (6): 664-676, 1961.

BROSIUS, J.; ULLRICH, A.; RAKER, M.A.; GRAY, A.; DULL, J.T.; GUTELL, R.R.; NOLLER, H.F. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *Escherichia coli*. **Plasmid.**, 6: 112-118, 1981.

BUISCHI, Y.A.P.; AXELSSON, P.; BARBOSA, M.F.Z.; BARRELLA, L.G.E.; DUARTE NETO, A.; LIMA, F.P. Situação bucal de escolares brasileiros: I – prevalência de

cárie dentária de *S. mutans* na saliva. **Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.**, 41(6): 319-321, 1987.

CAMPOS, C.C. **Contagem e identificação de estreptococos do grupo mutans em crianças com Síndrome de Down.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. 2001. 57 p.

CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediat. Dent.**, 19: 491-498, 1997.

CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent. Res.**, 72 (1): 37-45, 1993.

CAUFIELD, P.W.; RATANAPRIDAKUL, K.; ALLEN, D.N.; CUTTER, G.R. Plasmid – containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and radical cohorts: implications for natural transmission. **Infect. Immunol.**, 56: 3216-3220, 1988.

CAUFIELD, P.W.; WANNERMUEHLER, Y.M.; HANSEN, J.B. Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. **Infect. Immunol.**, 38: 785-787, 1982.

CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. **J.Clin. Microbiol.**, 27: 274-278, 1989.

CHAN, A.R. Dental caries and periodontal disease in Down's syndrome patients. **Univ. Tor. Dent. J.**, 7(1): 18-21, 1994.

CLARK, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Pathol.**, 5: 141-147, 1924.

COHEN, M.M.; WINER, R.A. Dental and facial characteristics in Down's syndrome (Mongolism). **J. Dent. Res.**, 44: 197-208, 1965.

CREIGHTON, W.E.; WELLS, B.H. Dental caries experience in institutionalized mongoloid and non mongoloid children in North Carolina and Oregon. **J. Dent. Res.**, 45(1): 66-75, 1966.

CRESPO, G.C. Maloclusiones más comunes en pacientes con Síndrome de Down, frecuencia de inflamación gingival, lengua escrotal y hábitos orales. **El Odontólogo**, 15-20, 1987.

CUTRESS, T.W. Dental caries in trisomy 21. **Archs. Oral Biol.**, 16(11): 1329-1344, 1971.

DASANAYAKE, A.S.; CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; STILES, H. M. Transmission of mutans streptococci to infants following short term application on an iodine NaF solution to mothers dentition. **Commun. Dent. Oral. Epidemiol.**, 21: 136-142, 1993.

DAVEY, A.L.; ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Archs. Oral Biol.**, 29(6): 453-460, 1984.

De SOET, J.J.; BOKHOUT, B.; BUIJS, J.F.; van LOVEREN; De GRAAF, J.; PRAHL-ANDERSEN, B. Transmission of mutans streptococci between mothers and children with cleft lip and/or palate. **Palate-Craniof. J.**, 35(5): 460-464, 1998.

De SOET, J.J.; TOORS, F.A.; De GRAAF, J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. **Caries Res.**, 23: 14-17, 1989.

DESAI, S.S.; FAYETTEVILLE, N.Y. Down Syndrome: a review of the literature. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, 84(3): 279-285, 1997.

DOWN, J.L.H. Observations on an ethnic classification of idiots. **London Hospital Reports**, 3: 259-262, 1866.

EMANUELSSON, I.R.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiol. Immunol.**, 13: 271-277, 1998.

EMANUELSSON, I.R.; THORNQVIST, E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. **Caries Res.**, 34: 133-139, 2000.

EMANUELSSON, I.R.; THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta Odontol. Scand.**, 59 (2): 93-98, 2001.

EMANUELSSON, I.R.; WANG, X. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. **Eur. J. Oral Sci.**, 106: 788-794, 1998.

FARMER III, J.J.. Mnemonic for reporting bacteriocin and bacteriophage types. **Lancet**, 2: 96, 1970.

FERREIRA, N.S-P.; AGUIAR, S.A.; SANTOS-PINTO, R. Frequência de giroversão dental em pacientes com Síndrome de Down. Estudo clínico. **ROBRAC**, 7(23): 24-26, 1998.

FIORATI, S.M.; SPÓSITO, R.A.; BORSATTO, M.C. Prevalência de cárie dentária e doença periodontal em pacientes com Síndrome de Down. **Odonto 2000**, 3(2): 58-62, 1999

FUJIWARA, T.; SASADA, E.; MIMA, N.; OOSHIMA, T. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, 19(3): 151-154, 1991.

FITZGERALD, R.J.; KEYES, P. H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in hamster. **J. Am. Dent. Assoc.**, 61:9-19, 1960.

GRONROOS, L.; SAARELA, M.; MATTO, J.; TANNER-SALO, U.; VUORELA, A.; ALALUUSA, S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. **Infect. Immun.**, 66(6): 2595-2600, 1998.

GUIMARÃES, M.S.; ZUANON, A.C.C.; SPOLIDORIO, D.M.P.; BERNARDO, W.L.C.; CAMPOS, J.A.D.B. Atividade de cárie na primeira infância: fatalidade ou transmissibilidade? **Cienc. Odontol. Bras.**, 7(4): 45-51, 2004.

GULLIKSON, J.S. Oral findings in children with Down's Syndrome. **J. Dent. Child.**, 293-297, 1973.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, 44(2):331-384, 1980.

HARDIE, J.M. Oral Streptococci. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 8.ed. Sneath, P.H.A et al. Baltimore: Williams & Wilkins. v.2, 1986. p. 1054-1062.

HATTORI, M. et al. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature**, 405: 311-319, 2000.

HÖFLING, J. Contagem de microrganismos cariogênicos na saliva de escolares da região de Piracicaba. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, 46(2): 749-752, 1992.

ITO, I.Y.; ALBUQUERQUE JR., R.F.; ALONSO-VERRI, R. Estreptococcus: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral. In: 15^a. JORNADA ODONTOLÓGICA DE RIBEIRÃO PRETO. **Anais...** São Paulo: USP, 1993. p.5.

JARA, L.; ONDARZA, A.; BLANCO, R.; VALENZUELA, C. The sequence of eruption the permanent dentition in chilean sample with Down's Síndrome. **Arch. Oral Biol.**, 38(1):85-89, 1993.

JENSEN, G.M.; CLEALL, J.F.; YIP, A.S. Dentoalveolar morphology and changes in Down's syndrome (trisomy). **Am. J. Orthod.**, 64(6); 607-618, 1973.

JORDAN, H.V.; ENGLANDER, H. R.; ENGLER, W.O.; KULCZYK, S. Observations on the implantation and transmission of *Streptococcus mutans* in humans. **J. Dent. Res.**, 51: 515-518, 1972.

KARN, T.A.; O'SULLIVAN, D.M.; TINANOFF, N. Colonization of mutans streptococci in 8- to 15-month-old children. **Journal of Public Health Dentistry**, 58(3): 248-249, 1998.

KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Archs. Oral Biol.**, 1: 304-320, 1960.

KLEIN, M. I.; FLÓRIO, F. M.; PEREIRA, A.C.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **J. Clin. Microbiol.**, 42(10): 4620-4626, 2004.

KLOCK, B.; KRASSE, B. Microbial and salivary conditions in 9- to 12- year-old children. **Scand. J. Dent. Res.**, 85: 56-63, 1977.

KOHLER, B.; ANDREEN, I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. **Archs. Oral Biol.**, 39(10): 907-911, 1994.

KOHLER, B.; BRATTHAL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. **Scand. J. Dent. Res.**, 86(1): 35-42, 1978.

KOHLER, B.; BRATTHAL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **J. Clin. Microbiol.**, 9: 584-588, 1979.

KOHLER, B.; BRATTHAL, D., KRASSE, B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. **Arch. Oral Biol.**, 28(3): 225-331, 1983.

KOHLER, B.; LUNDBERG, A.B.; BIRKHED, D.; PAPAPANOU, P. N. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. **Eur. J. Oral Sci.**, 111(5): 383-389, 2003.

KORENSTEIN, K.; ECHEVERRI, E.A.; KEENE, H.J. Preliminary observations on the relationship between mutans streptococci and dental caries experience within black, white and Hispanics families living in Houston, Texas. **Pediatr. Dent.**, 17: 445-450, 1995.

KROLL, R.G.; BUDNICK, J.; KOBREN, A. Incidence of dental caries and periodontal disease in Down's syndrome. **N. Y. State Dent. J.**, 36(3):151-156, 1970.

KULKARNI, G.V.; CHAN, K.H. SANDHAM, H.J. An investigation into the use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. **J. Dent. Res.**, 68: 1155-1161, 1989.

Le CLECH, G.; JOURNEL, H.; ROUSSEY, M.; Le MAREC, B. La Première Dentition du trisomique 21. A Propos de 114 enfants suivis régulièrement. **Ann. Pediatr. (Paris)**, 33(9): 795-798, 1986.

LeJEUNE, M.J.; GAUTHIER, M.; TURPIN, R. Les cromossomes humains en culture de tissus. **Comp. Rend. Acad. Sci. (Paris)**, 248(1): 602-603, 1959.

LI, Y.; CAULFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J. Dent. Res.**, 74(2): 681-685, 1995.

LI, Y.; CAUFIELD, P.W.; DASANAYAKE, A.P.; WIE NER, H.W.; VERMUND, S.H. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. **J. Dent. Res.**, 84(9): 806-811, 2005.

LI, Y.; DASANAYAKE, A.P.; CAUFIELD, P.W.; ELLIOT, R.R.; BUTTS, J.T. Characterization of maternal mutans streptococci transmission in an African American population. **Dent. Clin. N. Am.**, 47(1): 87-101, 2003.

LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Res.**, 34: 123-132, 2000.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C.G. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and caries development in children to mothers harboring both species. 38(2): 95-103, 2004.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, 50(4): 353-380, 1986.

LOESCHE, W.J; STRAFFON, L.H. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. **Infect. Immun.**, v.26, n.2, p. 498-507, Nov. 1979.

LOISEAU, G.; NARDOUX, M. Carie dentaire et trisomie 21. **Rev. Odontostomatol. (Paris)**, 5(2):105-118, 1976.

LONG, S.M.; FRAIZ, F.C.; REGO, M.A.; JORGE, A.O. Cárie dentária: transmissibilidade. **Revista de Odontopediatria**, 2(1): 35-43, 1993.

MANIATIS, F.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. 1989.

MARINHO DE JESUS, C. **Avaliação da presença de lesões de cárie dentária, biofilme bacteriano visível e análise microbiológica de *Streptococcus grupo mutans* em crianças de 12 a 48 meses de idade portadoras e não portadoras de Síndrome de Down**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" - UNESP. Araraquara - SP. 2002. 113 p.

MATEE, M.I.N.; MIKX, F.H.M.; de SOET, J.S.; MASELLE, S.Y.; de GRAAF, J.; van PALESNTEIN HELDERMAN, W.H. Mutans streptococci in caries-active and caries free infants in Tanzania. **Oral Microbiol. Immunol.**, 8: 322-324, 1993.

MATTOS-GRANER, R.O.; ZELANTE, F.; PEREZ, R.C.S.R.; MAYER, M.P.A. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com a frequência e severidade de cárie dental. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, 12(4): 309-314, 1998.

MORINUSHI, T.; LOPATIN, D.E.; TANAKA, H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's syndrome. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, 19(4): 279-284, 1995.

NIVEN J.R., C.F.; SMILEY, K.L.; SHERMAN, J.M. The hydrolysis of arginine by streptococci. **J. Bacteriol.**, 43: 651-660, 1942.

NÖR, J. Molecular biological techniques and their use to study streptococci in dental caries. **Austr. Dental J.**, 43: 87-98, 1998.

NORA, J.J.; FRASER, C. **Genética Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 24-28.

NYVAD, B.; KILLIAN, M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. **Caries Res.**, 24: 267-272, 1990.

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.**, 15(4): 258-262. 2000.

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.**, 51: 443-447, 2002.

OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F.; DOI, T.; SUZUKI, J.; MIURA, K.; KOZAI, K. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. **J. Med. Microbiol.**, 54: 661-665, 2005.

ONDARZA, A.; JARA, L.; BERTONATI, M.I.; BLANCO, R. Tooth malalignments in Chilean children with Down syndrome. **Cleft Palate-Craniofacial Journal**, 32(3): 188-193, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. World Health Organization – Oral Health Surveys: Basic methods, 4th, p.66, 1997.

ORNER, G. Dental caries experience among children with Down's syndrome and their sibs. **Arch. Oral Biol.**, 20(10): 627-634, 1975.

PERREIRA, M.B.B. **Período de aquisição dos estreptococos do grupo mutans em crianças atendidas no Programa Odontológico do Bebê da Central de Odontologia - SES - GO.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP. 2002. 74 p.

PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance and new technology. **Clin. Infect. Dis.**, 25: 858-870, 1997.

PIMENTA, F.C.; MARIN, J.M.; UZEDA, M.; ITO, I.Y. Prevalência de estreptococos do grupo mutans e leveduras na saliva de 93 membros de seis famílias. **Revista de Patologia Tropical**, 30(1): 15-22, 2001_a.

PIMENTA, F.C.; MARIN, J.M.; UZEDA, M.; ITO, I.Y. Prevalência de estreptococos do grupo mutans em 93 membros de seis famílias brasileiras. **Pesqui. Odontol. Bras.** 15(3): 181-186, 2001_b.

POWELL, L.V. Caries prediction: a review of the literature. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, 26(6): 361-371, 1998.

ROGERS, A. H. The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, 15(1): 26-31, 1981.

ROSA, R. T.; NAPIMOGA, M. H.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B.; ROSA, E.A.R. Typing *Streptococcus mutans* by multilocus enzyme electrophoresis. **Rev. Clin. Pesq. Odontol.**, 1(3): 11, 2005.

SANZ, J.J.A.; LEACHE, E.B.; MORENO GONZALEZ, P.J.P. Estudio epidemiológico de la prevalência de carie dental en pacientes con Síndrome de Down. **Rev. San. Hig. Pub.**, 63: 63-70, 1989.

SCHMIDT, M.G. **Avaliação de cárie dentária, níveis salivares de estreptococos do grupo mutans e capacidade tampão da saliva em crianças portadoras de Síndrome de Down na faixa etária de 6 a 14 anos.** 1995. 54 p. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal – Patologia Bucal) Faculdade de Odontologia, USP. São Paulo, 1995.

SHAPIRA, J.; STABHOLZ, A.; SCHURR, D.; SELA, M.N.; MANN, J. Caries levels, *Streptococcus mutans* counts, salivary pH, and periodontal treatment needs of adult Down syndrome patients. **Spec. Care Dentist.**, 11(6): 248-251, 1991.

SLAVIKIN, H.C. First encounters: transmission of infectious oral diseases from mother to child. **JADA**, 128: 773-778, 1997.

SOLÉ-VERNIN, C. Preservação de culturas microbianas por processos simples, com especial referência aos estreptococos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 3(1): 1-8, 1961.

SPLIETH, C.; BERNHARDT, O. Prediction of caries development for molar fissures with semiquantitative mutans streptococci tests. **Eur. J. Oral Sci.**, 107: 164-169, 1999.

SPOLIDORIO, D.M.P.; HÖFLING, J.F.; PIZZOLITTO, A.C.; ROSA, E.A.; NEGRINI, T.C.; SPOLIDORIO, L.C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian Family Members. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 213-217, 2003.

STABHOLZ, A.; MANN, J.; SELA, M.N.; SCHURR, D.; STEINBERG, D.; DORI, S.; SHAPIRA, J. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in preadolescent Down syndrome population. **Spec. Care Dentist.**, 11(5): 203-208, 1991.

STEINBERG, A.D.; ZIMMERMAN, S. The Lincoln dental caries study: a three-year evaluation of dental caries in persons with various mental disorders. **JADA**, 97(6): 981-984, 1978.

STEERS, E.; FOLTZ, E.L.; GROVES, V.S. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiotic. Chemother.**, 9: 307-311, 1959.

STRAETEMANS, M.M.E.; van LOVEREN, C.; de SOET, J.J.; de GRAAF, J.; ten CATE, J.M. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. **J. Dent. Res.**, 77(10):1851-1855, 1998.

TANZER, J.M. Testes microbiológicos e o manejo da doença cárie. **Jornal da ABOPREV**, ago./set : 11-12, 1999.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2233- 2239, 1995.

TENOVER F.C.; ARBEIT R.D.; GOERING R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for

Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 18(6): 426-439, 1997.

THIBODEAU, E.A.; O'SULLIVAN, D.M. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, 24:164-68, 1996.

THIBODEAU, E.A.; O'SULLIVAN, D.M. Salivary mutans streptococci and caries development in the primary and mixed dentitions of children. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, 27: 406-412, 1999.

THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Genética Médica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.139, 151 -154.

TORRES, S. A.; ROSA, O. P. S.; AKIYOSHI, N.; SILVEIRA, A. M.M. BRETZ, W.A. Níveis de infecção de estreptococos do grupo mutans em gestantes. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, 13(3), 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo>. Acesso em: 14 Nov 2005.

TUDOR, J.J.; MARRI, L.; PIGGOT, P. J.; DANEO-MOORE, L. Size of the *Streptococcus mutans* GS-5 Chromosome as determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Infect. Immun.**, 58(3): 838-840, 1990.

TWETMAN, S.; FRITZON, B.; JENSEN, B.; HALLBERG, U.; STAHL, B. Pre-and post-treatment levels of salivary mutans streptococci and lactobacilli in pre-school children. **Int. J. Paed. Dent.**, 9: 93-98, 1999.

VAN HOUTE, J.; GREEN, D.B. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. **Infect. Immun.**, 9(4): 624-630, 1974.

VAN HOUTE, J.; YANOVER, L.; BRECHER, S. Relationship of levels of the bacterium *Streptococcus mutans* in saliva of children and their parents. **Arch. Oral Biol.**, 26(5): 381-386, 1981.

VAN LOVEREN, C.; BUIJS, J.F.; ten CATE, J.M. Similarity of bacteriocin activity profiles of mutans streptococci within the family when the children acquired the strains after age of 5. **Caries Res.**, 34: 481-485, 2000.

VAN LOVEREN, C.; STRAETEMANS, M.M.E.; BUIJS, J.F. Similarity of mutans streptococci in mothers and children who acquired mutans streptococci after the age of 5. **Caries Res.**, 33: 281-282, 1999.

VAUGH, R.H.; LEVINE, M. Differentiation of the "Intermediate" coli-like bacteria. **J. Bacteriol.**, 44: 487-505, 1942.

VIGILD, M. Dental caries experience among children with Downs' syndrome. **J. Ment. Defic. Res.**, 30: 271-276, 1986.

WAN, A.K.L.; SEOW, W.K.; PURDIE, D.M.; BIRD, P.S.; WALSH, L.J.; TUDEHOPE, D.I. A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. **J. Dent. Res.**, 82(7): 504-508, 2003.

WHILEY, R.A.; BEIGHTON, D. Current classification of oral streptococci. **Oral Microbiol.**, 13: 195-216, 1998.

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

WINER, R.A.; COHEN, M.M.; FELLER, R.P.; CHAUNCEY, H.H. Composition of human saliva, parotid gland secretory rate and electrolyte concentration in mentally subnormal persons. **J. Dent. Res.**, 44: 632-634, 1965.

WINER, R.A.; FELLER, R.P. Composition of parotid and submandibular saliva and serum in Down syndrome. **J. Dent. Res.**, 51: 449-454, 1972.

WOLCOTT, M.J. DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. **J. Food Protect.**, 54: 387-401.

WOLF, W.C. Caries incidence in Down's syndrome (mongolism). **J. Wisconsin**, 43(1): 3-7, 1967.

YARAT, A.; AKYÜZ, S.; KOÇ, L.; ERDEN, H.; EMEKLI, N. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH buffering capacity and caries indices in subjects with Down's Syndrome. **J. Dent.**, 27: 115-118, 1999.

YANO, A.; KANEKO, N.; IDA, H.; YAMAGUCHI, T.; HANADA, N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, 217: 23-30, 2002.

ZANATA, R.L.; NAVARRO, M.F.L.; PEREIRA, J.C.; FRANCO, E.B.; LAURIS, J.R.; BARBOSA, S.H. Effect of caries preventive measures directed to expectant mothers on caries experience in their children. **Braz. Dent. J.**, 14(2): 75-8, 2003.

ZERO, D.T. Dental caries process. **Dent. Clin. of North America**, 43(4): 653-664, 1999.

ZHU, H.; WILLCOX, M.D.P.; KNOX, K. W. A new species oral *Streptococcus* isolated from Sprague-Dawley rats, *Streptococcus orisratti* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50(1): 55 -6, 2000.

ZICKERT, I.; EMILSON, C.G.; KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. **Infect. Immun.**, 39(2): 982-985, 1983.

ANEXOS

ANEXO 1

POR FAVOR LEIA E ESCUTE ATENTAMENTE ESTES ESCLARECIMENTOS. OBRIGADA!

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Será esclarecido(a) sobre as informações da mesma e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final do documento que estará em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. **Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma.** Pergunte à dentista o que quiser saber! Não fique com dúvidas. Se quiser consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, os telefones são: : 3521-1215 e 3521-1076.

Informações sobre a pesquisa

“Estreptococos do grupo mutans transmissão vertical entre crianças com Síndrome de Down e suas mães”.

Pesquisador responsável: Cerise de Castro Campos

- Professora Assistente da Faculdade de Odontologia da UFG
- Especialista em Odontopediatria e Odontologia para Pacientes Especiais
- Mestre em Medicina Tropical, área de concentração em Microbiologia

Telefone para contato: 3209-6060 e 9979-3412

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

- A cárie é uma doença que tem muitos fatores envolvidos, sendo que a bactéria causadora (estreptococos mutans) tem papel muito importante, pois inicia e mantém o processo cariioso.
- Quanto maior o número dessa bactéria presente na boca maior a chance de uma pessoa desenvolver cárie.
- Tudo indica que a primeira fonte de transmissão é a mãe.
- Por isso tão importante conhecer o mecanismo de colonização do estreptococos mutans na Síndrome de Down.
- Estaremos assim contribuindo para que os profissionais de Odontologia direcionem corretamente o diagnóstico e tratamento em relação a saúde bucal de crianças com Síndrome de Down.

Condução do Estudo:

- Os responsáveis pela criança responderão um questionário sobre saúde da mesma e dados relativos à família.
- Será feita uma coleta de saliva da boca das crianças e suas mães, através de uma espátula de madeira esterilizada e descartável
- Em seguida, os dentes de ambos serão examinados.
- O material será levado ao laboratório para exame e processamento.

Quem participará do estudo: Crianças com Síndrome de Down com idade até 12 anos e suas mães.

Risco:

- Nenhum, visto que é um procedimento largamente conhecido e empregado em Odontologia, minimamente invasivo.

Benefícios:

- Os dados relativos à Síndrome de Down e estreptococos mutans na literatura especializada são escassos.
- O resultado da contagem de colônias bacterianas será levado ao conhecimento dos responsáveis. As crianças serão incluídas num programa de promoção de saúde bucal da Faculdade de Odontologia da UFG.
- Os dados serão utilizados para tese de doutorado que permitirá delineamento de decisões no diagnóstico, tratamento e prevenção da cárie em crianças com Síndrome de Down.

Confidencialidade:

- Os dados a serem utilizados deste estudo terão como princípio básico a manutenção do sigilo e da integridade moral e física de quaisquer participantes, ficando o pesquisador do projeto responsável pelo cumprimento dessa conduta profissional.

A legislação e regulamentos vigentes com respeito à Ética em Pesquisa serão estritamente observados.

Declaro ter explicado em detalhes os procedimentos acima descritos e ter concedido a oportunidade de se fazer quaisquer perguntas que julgar necessário para melhor esclarecimento.

Cerise de Castro Campos

Declaro ter entendido as explicações recebidas e concordo livremente em participar do estudo, podendo desistir em qualquer momento.

Nome da criança: _____ N. do prontuário _____

Data: ____/____/____

Assinatura do responsável CI _____

1ª. _____ 2ª. _____

Testemunhas

ANEXO 2

Meios de cultura, soluções e reagentes

Agar sacarose bacitracina (SB 20)

O meio de cultura para o isolamento e contagem das unidades formadoras de colônia (ufc) dos estreptococos do grupo mutans, foi proposto por Davey & Rogers (1984), apresenta a seguinte composição:

Casitona.....	15,0g
Extrato de levedura.....	5,0g
L-cisteína.....	0,2g
Sulfito de sódio.....	0,1g
Acetato de sódio.....	20,0g
Sacarose.....	200,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000,0mL

Para a preparação do meio de cultura os componentes serão pesados em balança granatária e colocados em um Erlenmeyer. A água destilada será adicionada, homogeneizando para a dissolução dos componentes e o meio autoclavado a 120°C por 15 minutos. Após a esterilização, o meio de cultura será resfriado a 50°C em banho maria e adicionar-se-à 1,0% de uma solução de bacitracina, na concentração final de 0,2 U/mL. Em condições assépticas, será distribuído 5,0 mL do meio de cultura em placas de Petri de 50x10mm. Estas placas serão submetidas a testes de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados, serão armazenadas na geladeira e utilizadas no período máximo de sete dias.

Solução de bacitracina

Pesa-se 3,3 mg do sal de bacitracina (potência 63U/1000,0ug) em balança analítica e, em condições assépticas adiciona-se 10,0 mL de água destilada esterilizada.

Caldo tioglicolato de sódio

O caldo tioglicolato de sódio sem indicador e sem glicose (Difco®) será empregado para o repique das colônias de estreptococos e preparação dos inóculos bacterianos para a realização das provas bioquímicas. A fórmula comercial apresenta a seguinte composição:

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

Para o preparo do caldo serão pesados 24,0g do pó comercial em balança granatária, colocado em Becker, adicionando-se 1000,0mL de água destilada, homogeneizando, aquecendo até fervura e 5,0 mL distribuídos em tubos de ensaio de 12x12mm., após o que, o caldo será esterilizado a 120⁰C por 15 minutos.

Agar tioglicolato de Sódio

O caldo tioglicolato de sódio apresentado no item anterior será utilizado como meio de cultura para obtenção do àgar tioglicolato de sódio suplementado com

carboidratos. O ágar empregado para a realização das provas de fermentação é preparado de acordo com Beighton et al. (1991b) e modificado por Ito et al. (1993).

Os carboidratos utilizados serão: manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e lactose, todos de procedência da Merck® . Composição:

Caldo tioglicolato de sódio.....	100,0mL
Púrpura de bromocresol 1,6%.....	0,1mL
Agar.....	1,5g
Carboidrato.....	2,0g

A 100,0mL do caldo de tioglicolato de sódio adicionar-se-à 0,1mL da solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 1,6% bem como o carboidrato e o pH acertado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1N. Adicionar-se-à 1,5g de ágar e o meio de cultura será autoclavado a 120⁰C durante 15 minutos. As placas serão submetidas à prova de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenados na geladeira.

A rafinose somente será adicionada ao meio de cultura após autoclavagem.

Solução de Púrpura de Bromocresol

O púrpura de bromocresol é utilizado para a observação de alterações do pH na faixa de 5,2 a 6,8. A solução alcoólica apresenta a seguinte formulação:

Púrpura de Bromocresol.....	1,6g
Hidróxido de sódio.....	0,6mL
Álcool etílico.....	100,0mL

A 1,6g de púrpura de bromocresol pesado, colocado em um cálice será adicionado 0,6mL de hidróxido de sódio 1N, para a dissolução e adicionado 5,0mL do álcool etílico. A seguir, a solução será transferida para um balão volumétrico e volume completada com o álcool para 1,000mL. A solução será estocada em frasco âmbar com rolha esmerilhada.

Agar manitol bacitracina

A resistência a bacitracina será avaliada empregando o ágar tioclicolato de sódio com manitol, suplementado com esse antibiótico. O ágar tioglicolato de sódio manitol será preparado como descrito anteriormente. Adicionar-se-à 1,0% da solução de bacitracina para a obtenção de uma concentração final de 2,0U/mL, após o resfriamento a 50⁰C, em condições assépticas. O meio de cultura será distribuído (20mL) em placas de Petri 20x200mm nas mesmas condições. As placas serão submetidas à prova de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas na geladeira.

Ágar esculina

O ágar será preparado de acordo com Vaugh & Levine (1942), modificado por Ito et al. (1993) e apresenta a seguinte constituição:

Peptona.....	0,5g
Fosfato dipotássico.....	0,1g
Esculina.....	0,3g
Citrato férrico.....	0,05g
Ágar.....	1,0g
Água destilada.....	100,0mL

Todas substâncias serão pesadas em balança granatária. O citrato férrico será primeiramente pesado e colocado em um Erlenmeyer, adicionando um

pouco de água e aquecendo até completa dissolução. Após, serão adicionados os outros componentes bem como completado o volume para 100,0mL com água destilada. O ágar será autoclavado a 120^oC por 15 minutos e 20mL distribuídos em placas de Petri de 20x200mm em condições assépticas. As placas serão submetidas à prova de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas na geladeira.

Ágar infusão de cérebro e coração

O ágar infusão de cérebro e coração (Difco[®]) será utilizado como ágar base para a verificação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O ágar é constituído de:

Infusão de cérebro bovino.....	200,0g
Infusão de coração bovino.....	250,0g
Proteose peptona.....	10,0g
Bacto dextrose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato dissódico.....	2,5g
Ágar.....	15,0g

Para o preparo do ágar serão pesados 37,0g do pó comercial em balança granatária, colocado em Erlenmeyer, adicionado 1000,0mL de água destilada, homogeneizado e esterilizado a 120^oC por 15 minutos. Serão distribuídos 20mL do ágar em placas de Petri de 20x200mm em condições assépticas. As placas serão submetidas à prova de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas na geladeira.

Ágar p-dianisidina

O ágar p-dianisidina será utilizado para a verificação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), preparado conforme Whittenbury (1964) e modificado por Ito et al. (1993), que substituíram o sangue de carneiro por sangue de coelho e a o-anisidina para a p-anisidina. Composição:

Ágar infusão de cérebro e coração.....100,0mL
p-anisidina.....0,1g
Sangue hemolisado de coelho.....5,0mL

Ao meio de cultura ágar infusão de cérebro e coração esterilizado, a temperatura 80°C serão adicionados, em condições assépticas, o sal p-anisidina e sangue hemolisado de coelho. Serão distribuídos 20,0mL, em placas de Petri de 20x200mm e estas submetidas à prova de esterilidade, acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados e armazenadas na geladeira.

O sangue de coelho será obtido pela punção cardíaca e colocado em frascos, com pérolas de vidro, homogeneizado, cuidadosamente, durante 5 minutos, para que ocorra a desfibrinação (Solé-Vernin,1961). Para o emprego no ágar p-dianisidina, o sangue hemolisado será preparado adicionando 2,5mL de água destilada esterilizada a 2,5mL do sangue desfibrinado de coelho e homogeneizando vigorosamente para facilitar a lise das hemácias.

Caldo arginina

Este meio de cultura será utilizado para a detecção da produção de amônia a partir da arginina. Preparado conforme Niven Jr. et al. (1942) e apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	0,5g
Triptona.....	0,5g
Fosfato dissódico.....	0,2g
Glicose.....	0,05g
D/L-arginina.....	0,3g
Água destilada.....	100,0mL

Todos os componentes serão pesados em balança granatária e dissolvidos em um cálice, o pH acertado para 7,0 com hidróxido de sódio a 1N e distribuído 4,0mL em tubos de ensaio 13x100. O caldo será esterilizado a 120⁰C por 15 minutos e a seguir submetido ao teste de esterilidade e armazenados a temperatura ambiente até o seu uso.

Reativo de Nessler

A amônia será evidenciada com o emprego do reativo de Nessler, preparado de acordo com Bier, 1985:

Dissolver 50g de KI (iodeto de potássio) em cerca de 35 mL de água destilada. Adicionar, gota a gota, uma solução de HgCl₂ (cloreto de mercúrio) até que persista um leve precipitado. Adicionar 400mL uma solução a 50% de KOH (hidróxido de potássio), dissolver a potassa, deixar em repouso até clarear, decantar. Completar o volume total a 1 litro com água destilada, deixar repousar uma semana e decantar. Conservar em vidro escuro com rolha esmerilada.

Solução de cloreto de mercúrio

Cloreto de mercúrio.....	2,5g
Água destilada.....	100,0mL

Solução de hidróxido de potássio

Hidróxido de potássio.....15,0g
Água destilada.....100,0mL

Serão dissolvidos 5,0g de iodeto de potássio em 5,0mL de água destilada, adicionando, gradativamente, os 10,0mL da solução de cloreto de mercúrio, com cuidado para que o precipitado, inicialmente formado seja dissolvido. Após o resfriamento, serão adicionados 30,0mL da solução de hidróxido de potássio e água destilada até completar o volume de 100mL. Depois de decantado, o sobrenadante será acondicionado em frasco âmbar e armazenado na geladeira. Este reativo será utilizado para detecção qualitativa de amônia a partir da arginina.