

Análise do sorotipo e dos genes para mutacinas em *Streptococcus mutans* isolados de pré-escolares com diferentes experiências de cárie

Analysis of serotypes and gene for mutacins in streptococcus mutans isolated from preschool children with different caries experiences

Márcia Regina RODRIGUES

Mestranda em Odontologia – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

Sandra Mara MACIEL

Doutora em Saúde Pública – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

Flaviana Bombarda de Andrade FERREIRA

Doutora em Endodontia – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

Augusta PIOVEZAN

Graduanda em Odontologia – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

Flávio José Sambatti PIERALISI

Mestre em Odontologia – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

Regina Célia POLI-FREDERICO

Doutora em Genética Molecular – UNOPAR – Universidade Norte do Paraná – Londrina – PR – Brasil

RESUMO

Streptococcus mutans são freqüentemente isolados do biofilme dentário e de lesões cariosas, encontrados em praticamente todos os indivíduos com alta, média, até baixa prevalência de cárie. Porém a simples detecção destes microrganismos não justifica o desenvolvimento da doença. A existência de grande diversidade genotípica nas espécies de *S. mutans* pode resultar na colonização da cavidade bucal por cepas com diferentes características de virulência. Os objetivos desse estudo foram avaliar a freqüência dos sorotipos *c*, *e* e *f* e os genes para as mutacinas I, II, III e IV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos *S. mutans* isolados de pré-escolares sem e com história de cárie dentária. O sorotipo *c* foi o mais predominante (80%). A infecção mista (*c* e *f*) foi evidenciada em 20% dos pré-escolares com cárie. Todos os isolados de *S. mutans* foram negativos para os genes das mutacinas I/III. No grupo livre de cárie, 60% dos isolados foram positivos para o gene da mutacina II e 40% para o da mutacina IV. Por outro lado, 80% e 70% dos pré-escolares com cárie mostraram genótipos positivos para os genes das mutacina II e IV, respectivamente. Foi observada a relação positiva entre sorotipo e presença dos genes para as mutacinas II/IV nos pré-escolares com cárie dentária ($r = 0,69$, $P < 0,05$). Esses resultados sugerem que múltiplos sorotipos e presença dos genes para mutacinas II/IV estão relacionados com a cariogenicidade de *S. mutans*.

UNITERMOS

Streptococcus mutans; sorotipo; mutacina; cárie dentária; reação em cadeia da polimerase; pré-escolares.

INTRODUÇÃO

O *Streptococcus mutans* (SM) é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária em hu-

manos e fatores de virulência tais como a composição de sua superfície celular (sorotipo) e a produção de bacteriocinas (mutacinas) têm sido investigados em relação à sua cariogenicidade.

Linhagens de *S. mutans* são classificadas dentro de três sorotipos (*c*, *e* e *f*) e a especificidade sorológica é definida pelo polissacarídeo ramnose-glicose (RGP) presente em sua parede celular.¹³ A maioria dos indivíduos é colonizada com somente um sorotipo de *S. mutans*. De acordo com Loesche¹³ (1986), múltiplos sorotipos podem ser evidenciados em 10-20% dos indivíduos na maioria das populações independente de idade, país, local de coleta da amostra ou isolamento e procedimento de sorotipagem. Suspeita-se que o sorotipo *c* deva ser o progenitor dos outros sorotipos. As linhagens com sorotipo *e* e *f* devem ter sido originadas a partir de uma mutação pontual no loco determinante do sorotipo *c* ou uma deleção de uma porção deste loco.⁷

O papel das mutacinas *in vivo* ainda não está claro, entretanto a atividade antimicrobiana destas substâncias deve conferir uma vantagem ecológica para a produção de linhagens na comunidade bacteriana assim como no biofilme dentário² e pode também ser importante para o estabelecimento de *S. mutans in vivo*.^{2,9}

A classificação das linhagens produtoras de mutacina baseadas na sua atividade bactericida, sensibilidade para outras ou para a própria mutacina produzida e presença de plasmídios, divide as mutacinas em quatro tipos I, II, III e IV.^{4,20,23} Os genes estruturais dos prepropeptídeos de mutacinas I, II, III e IV (*mutA*) foram seqüenciados.^{20,21,22}

A capacidade de produção de mutacina pode favorecer a instalação e colonização de *S. mutans* no biofilme dentário aumentando o risco de cárie.⁸ Mas Alaluusua et al.¹ (1991) e Longo et al.¹⁴ (2003) não encontraram associação entre atividade mutacínica e o número de *S. mutans* ou a incidência de cárie, entretanto, Fabio et al.⁵ (1987) mostraram associação positiva entre as proporções de *S. mutans* com o total de estreptococos bucais e o potencial mutacínico. Adicionalmente, Kamiya et al.¹⁰ (2005) demonstraram produção distinta de mutacinas entre *S. mutans* isolados de indivíduos adultos livres de cárie e com cárie ativa.

As mutacinas podem apresentar um importante papel biológico na regulação e composição do biofilme dental, tanto na atividade de sinergismo ou antagonismo, sugerindo que o largo espectro de mutacinas pode ser mais importante na colonização e estabilização das espécies cariogênicas, mantendo e estabelecendo nichos e atividade microbiana altamente complexa.¹⁷ Talvez esse componente explique por que uma vez que *S. mutans* tornem-se estabelecidos, eles são dificilmente eliminados da microbiota bucal.¹

Estudos sobre a correlação dos fatores de virulência de SM e a diversidade das espécies são fundamentais para entender a colonização de diferentes genótipos no mesmo indivíduo e a expressão de características que podem ou não influenciar sua virulência e capacidade de sobreviver em diferentes condições ambientais.¹⁷

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar isolados de *Streptococcus mutans* quanto ao sorotipo específico, genes codificadores de mutacinas em pré-escolares com diferentes experiências de cárie dentária.

MATERIAIS E METODOS

População de estudo

A população de estudo consistiu de 20 pré-escolares de 4 e 5 anos de idade, pertencente a 11 Centros de Educação Infantil (CEMEIs) da cidade de Londrina-PR.

Este projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Norte do Paraná, PR (UNOPAR) e à apreciação da Secretaria de Educação de Londrina, PR. Os responsáveis legais dos pré-escolares foram esclarecidos sobre a natureza do trabalho e também sobre a necessidade da obtenção de uma autorização, de acordo com o Código de Ética Profissional e orientações contidas na Resolução 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, para pesquisas envolvendo seres humanos. Após explicação a respeito dos riscos e benefícios dos procedimentos, todos os envolvidos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido autorizando, portanto, a realização do exame bucal e coleta de saliva.

O exame das condições bucais foi baseado na experiência de cárie dentária, seguindo os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde.²⁴ Os exames foram conduzidos por um único examinador, sob luz natural em condições ambientes, com o auxílio de espelho clínico e sonda para remoção de detritos.

Os participantes foram recrutados com base nos seguintes critérios: 1) residir em área com nível ótimo de flúor na água, 2) não possuir doença sistêmica e 3) não ter usado medicação num período de 15 dias antes do estudo e foram agrupados de acordo com sua experiência de cárie em: aqueles que apresentaram ceo-d= 0 foram classificadas como livres de cárie e ceo-d maior ou igual a 1 como tendo experiência da doença.

Coleta da amostra

Esta população de estudo foi submetida à coleta de saliva, estimulando-a por 1 minuto com película de parafina e coletada pelo método da espátula de madeira, descrito por Köhler e Bratthall¹¹ (1979). Semeou-se a saliva em superfície de ágar mitis salivarius bacitracina⁶ e incubada em estufa a 37° C, durante 48 horas. Com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP), foram retiradas 10 colônias suspeitas de pertencerem aos estreptococos do grupo *mutans* (*S. mutans*). Cada colônia foi transferida para um microtubo contendo meio BHI e incubada por 24h em jarras de anaerobiose.

As células bacterianas crescidas em meio BHI foram lavadas e fervidas por 10 min. em tampão TE (tris-HCl 10mM; EDTA 1 mM pH 8.0). O sobrenadante foi utilizado para a identificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que flanqueiam o gene da Glicosiltransferase (GTFB-F e GTFB-R - 517 pb) descritos previamente por Oho et al.¹⁹ (2000). Uma linhagem de referência (ATCC 25175) foi usada como controle positivo de *S. mutans* e água destilada foi utilizada como controle negativo da PCR.

Análise molecular dos genes envolvidos na biossíntese de polissacarídeos específico para sorotipo de *S. mutans*

Foram avaliados 200 isolados clínicos e uma linhagem de referência de *S. mutans* quanto aos sorotipos *c*, *e* e *f*. Os *primers* específicos para os sorotipos utilizados foram os descritos por Shibata et al.²³ (2003) e estão apresentados na Tabela 1.

As condições da PCR multiplex específica para os sorotipos *c*, *e* e *f* consistiram de 0,2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado, 10 mM do Tampão (pH8,0), 2mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 0,5 μM de cada primer e 1μL de amostra de DNA. Após a desnaturação a 94°C por 5 min, um total de 35 ciclos foi realizado; cada ciclo consistiu por 15s de desnaturação a 96°C, 30s de pareamento a 61°C e 1 min de extensão a 72°C, seguido de um ciclo de extensão a 72°C por 5 min. Os amplicons foram separados pela eletroforese em gel de agarose (1%). O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado por meio da luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Nikon 5S.

Análise molecular dos genes envolvidos na produção de mutacinas pelo *S. mutans*

Primers homólogos aos genes *mutA* codificadores do tipos I, II, III e IV de mutacinas foram utilizados os descritos no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como mostrado na Tabela 2. Cada mistura da PCR (10μL) consistiu de tampão (1x) com MgCl₂ 7mM, 200 pmol de cada *primer*, 1U Taq DNA polimerase e 50 ng de amostra de DNA. Após a desnaturação a 94°C por 5 min, as condições da PCR incluíram 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 30s, pareamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 5min. Os amplicons foram separados pela eletroforese em gel de agarose (1%). O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado por meio da luz ultravioleta e fotografado com câmera digital Nikon 5S.

Tabela 1 - Primers para PCR específica para os sorotipos *c*, *e* e *f* de *S. mutans*.

Primer	Seqüência (5' a 3')	pb*	Referência
SC-F	CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG	727	Shibata <i>et al.</i> ²³ (2003)
SC-R	AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT		
SE-F	CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC	517	Shibata <i>et al.</i> ²³ (2003)
SE-R	CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA		
SF-F	CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA	316	Shibata <i>et al.</i> ²³ (2003)
SF-R	TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG		

* pb - tamanho do fragmento em pares de base

Tabela 2 - Primers para PCR específica para os genes mutacinas I/III, II e IV de *S. mutans*.

Primer	Seqüência (5' a 3')	pb*	Referência
Mut I/III-F	AGTTTCAATAGTTACTGTTGC	750/450	Qi <i>et al.</i> ²⁰ (1999)
Mut I/III-R	GCCAAACGGAGTTGATCTCGT		
Mut II-F	AACGCAGTAGTTTCTTTGAA	444	Novak <i>et al.</i> ¹⁸ (1994)
Mut II-R	TTCCGGTAAGTACATAGTGC		
Mut IV-F	ATGGGATATTTAAAGGGAAA	1344	Qi <i>et al.</i> ²² (2001)
Mut IV-R	TCAGAGCAGCTACAAAAACT		

* pb - tamanho do fragmento em pares de base

Procedimentos Estatísticos

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pela utilização do pacote estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 15 – (correlação de Pearson ou Spearman, teste de Qui-quadrado) e correlacionados com a experiência de cárie dos pré-escolares. O nível de significância utilizado foi $p < 0,5$.

RESULTADOS

A amplificação do gene *gtfB* foi obtida para todos os 200 isolados de *S. mutans* dos pré-escolares e para a linhagem de referência de *S. mutans* ATCC 25175.

A totalidade dos isolados dos pré-escolares sem cárie apresentavam apenas o sorotipo *c* (Tabela 3), enquanto que dois de 10 (20%) isolados dos pré-escolares com história de cárie tinham ambos os sorotipos *c* e *f* (Tabela 4). O sorotipo *e* não foi identificado nas amostras analisadas. Os produtos da amplificação por meio da PCR para os sorotipos *c* e *f* podem ser vistos na Figura 1.

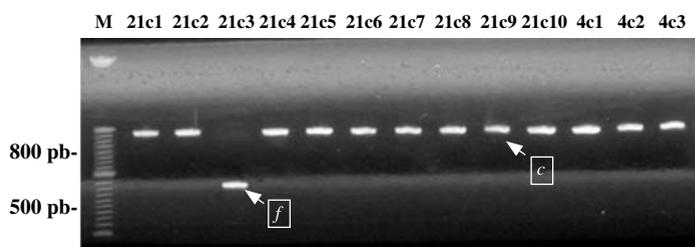


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para os sorotipos de antigenicidade *c* e *f* dos isolados de *S. mutans*. As setas mostram bandas referentes ao sorotipo *c* do *S. mutans* (727 pb) e para o sorotipo *f* (316 pb). M = Marcador de peso molecular (DNA Ladder 50 pb, Life Technologies-Gibco).

No grupo livre de cárie, a PCR com o *primer* para o gene da mutacina IV revelou que quatro de 10 (40%) linhagens foram positivas para esta mutacina e seis de 10 (60%) dos isolados apresentaram os genes para a mutacina II (Tabela 3).

A PCR para o gene da mutacina II mostrou que oito de 10 (80%) linhagens foram positivas no grupo dos pré-escolares com história de cárie, e os amplicons da mutacina IV revelou que sete das 10 (70%) linhagens abrigavam esses genes (Tabela 4). Entretanto, não foram identificadas diferenças significantes no número de linhagens positivas que abrigavam os genes para as mutacinas II e IV quando se comparou os isolados de *S. mutans* nos grupos livre de cárie e com história desta doença. A figura 2 mostra a eletroforese dos produtos amplificados para os genes das mutacinas II e IV.

Nenhum isolado de *S. mutans* dos pré-escolares apresentou os genes para as mutacinas I e III (Tabelas 3 e 4).

Correlação positiva foi encontrada no número de linhagens positivas que carregavam os genes para as mutacinas II e IV e o sorotipo nos pré-escolares com história de cárie ($r = 0,699$, $P < 0,05$). Nas crianças livres do ataque de cárie este resultado não foi observado.

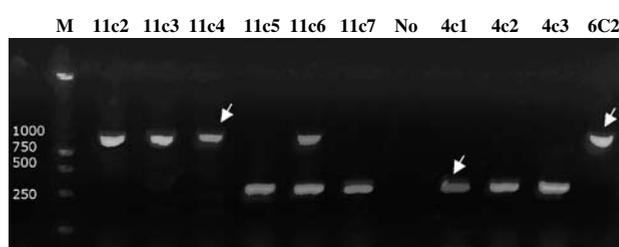


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR para os genes das mutacinas II (444 pb) e IV (1344pb). M = Marcador de peso molecular (DNA Ladder 250 pb, Life Technologies-Gibco).

Tabela 3 - Detecção dos genes para as mutacinas I/III, II e IV por meio da PCR em 10 linhagens isoladas de *S. mutans* de pré-escolares livres de cárie

Isolado de <i>S. mutans</i>	PCR para Mutacina II	PCR para Mutacina IV	PCR para mutacina I/III	PCR para Sorotipo
4	+	-	-	<i>c</i>
6	+	+	-	<i>c</i>
14	+	-	-	<i>c</i>
15	+	+	-	<i>c</i>
16	+	+	-	<i>c</i>
5	+	+	-	<i>c</i>
6 ^a	-	-	-	<i>c</i>
19	-	-	-	<i>c</i>
22	-	-	-	<i>c</i>
11	-	-	-	<i>c</i>
Total (n = 10)	6	4	0	

Tabela 4 - Detecção dos genes para as mutacinas I/III, II e IV por meio da PCR em 10 linhagens isoladas de *S. mutans* de pré-escolares com cárie

Isolado de <i>S. mutans</i>	PCR para Mutacina II	PCR para Mutacina IV	PCR para mutacina I/III	PCR para Sorotipo
2	-	-	-	<i>c</i>
11	+	+	-	<i>c</i>
20	+	+	-	<i>c</i>
21	-	-	-	<i>c e f</i>
11	+	+	-	<i>c</i>
12	+	+	-	<i>c</i>
23	+	-	-	<i>c e f</i>
29	+	+	-	<i>c</i>
1	+	+	-	<i>c</i>
4	+	+	-	<i>c</i>
Total (n = 10)	8	7	0	

DISCUSSÃO

Estudos da biodiversidade de espécies cariogênicas podem ser promissores, principalmente se associados às análises dos fatores de virulência e patogenicidade dos principais agente etiológicos da cárie dental, visto que diferentes genótipos em um mesmo indivíduo podem variar na expressão das características patogênicas.^{12,3,15}

A maioria dos indivíduos é colonizada com somente um sorotipo. Múltiplos sorotipos podem ser evidenciados em 10-20% dos indivíduos na maioria das populações.¹³

Os achados do presente estudo mostraram predominância do sorotipo *c*, seguida do sorotipo *f* e

ausência do sorotipo *e*. Vale ressaltar que a infecção mista (sorotipos *c* e *f*) foi encontrada em linhagens isoladas de *S. mutans* em pré-escolares com cárie dentária. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Shibata et al.²³ (2003) que encontraram que a experiência de cárie no grupo com infecção por múltiplos sorotipos de *S. mutans* foi significativamente maior do que nos grupos com monoinfecção.

Em função de que a produção de mutacina pelo *S. mutans* pode favorecer sua instalação, sua colonização e aumentar o risco de cárie, foi investigado nesta pesquisa a frequência dos genes para mutacinas em linhagens de *S. mutans* isoladas de pré-escolares com diferentes experiências de cárie dentária. Foi constatado que as linhagens de *S. mutans* isoladas de pré-

escolares com história de cárie apresentaram maiores freqüências de detecção dos genes para mutacinas II e IV quando comparada às linhagens recuperadas de pré-escolares livres desta doença.

Qi et al.²² (2001) pesquisaram isolados clínico de *S. mutans* para a presença do gene para a mutacina IV por meio da PCR e encontraram >50% de resultados positivos. Estes autores ainda sugerem que a mutacina IV seria produzida por células planctônicas, na saliva e este fato deve contribuir para que o *S. mutans* elimine os colonizadores primários da superfície do dente e estabeleça sua própria população.

Kamiya et al.¹⁰ (2005) encontraram que linhagens de *S. mutans* removidos de indivíduos cárie-ativos, mostraram maior freqüência de detecção de mutacina IV do que os *S. mutans* retirados de indivíduos livres de cárie. Contudo não evidenciaram a presença do gene para a mutacina II nos dois grupos estudados. Longo, Mattos-Graner e Mayer¹⁴ (2003) analisaram 19 linhagens isoladas de crianças e encontraram somente uma linhagem que mostrou um amplicon homólogo ao gene para mutacina II.

Ainda no presente estudo, não foi identificado os genes para as mutacinas I e III em nenhum dos dois grupos, o que também ocorreu nos achados de Longo, Mattos-Graner e Mayer¹⁴ (2003), diferentemente dos resultados encontrados por Kamiya et al.¹⁰ (2005) que demonstraram ampliações correspondentes aos genes para a mutacina I/III no grupo cárie-ativo.

Diferentes mutacinas podem servir a diferentes propósitos durante o processo de colonização do *S. mutans*. A mutacina IV parece ser importante na fase inicial de colonização, eliminando os colonizadores primários os *S. sanguinis*, já que seu espectro antimicrobiano é específico contra essas espécies. Após o estabelecimento do *S. mutans* na superfície dental, inicia a síntese de mutacina I, pelas células do biofilme, agindo na inibição de competidores potenciais de diversas espécies. O espectro antimicrobiano da mutacina IV é especificamente contra membros do grupo *mitis* de streptococos bucais.²²

Estudos sugerem que a alta complexidade da microbiota bucal, como a que é encontrada nos indivíduos cárie-ativos¹⁶, é causada pelos *S. mutans* que apresentam alta freqüência do gene para mutacina IV e um amplo espectro de mutacinas, tais como II e III podendo tornar-se prevalente na maioria dos sítios bucais.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que as linhagens isoladas de *S. mutans* de pré-escolares com história de cárie apresentaram múltiplos sorotipos (*c* e *f*) e maior proporção dos genes para as mutacinas II e IV, havendo correlação positiva entre o número de linhagens positivas que abrigavam os genes para estas mutacinas e o sorotipo nos pré-escolares com cárie ($r = 0,699$, $P < 0,05$). Nas crianças livres do ataque de cárie este resultado não foi observado.

ABSTRACT

Streptococcus mutans are frequently isolated from the dental biofilm and from lesions of caries. They are found in almost all individuals with high, medium, and even low caries experience. However, the simple detection of such microorganisms doesn't justify dental caries development. The existence of high genotypic diversity in *S. mutans* species may result in the colonization of the oral cavity by strains with different virulence characteristics. The aims of this study were to evaluate the frequency of serotypes *c*, *e* and *f* and to detect genes encoding mutacin types I, II, III and IV by polymerase chain reaction (PCR) in a total of 200 *S. mutans* genotypes isolated from preschool children with and without dental caries. The serotype *c* was the most frequent (80%). The mixed infection (*c* and *f*) was observed in 20% of the preschools with caries. All tested *S. mutans* isolates were negative for mutacins I and III. In the caries-free group, 60% of the isolates were positive for mutacin II and 40% for mutacin IV. On the other hand, 80% and 70% of the preschool children with caries showed positive genotypes for the mutacins II and IV, respectively. A positive correlation ($r = 0.69$) between serotypes and mutacins II/IV was observed in the preschool children with dental caries. These results suggest that multiples serotypes and presence of genes encoding mutacin II/IV are related to the *S. mutans* cariogenicity.

UNITERMS

Streptococcus mutans; serotype; mutacin; dental caries; Polymerase chain reaction; preschool children.

REFERÊNCIAS

- Alaluusua S. Transmission of mutans streptococci. Proc Finn Dent Soc. 1991;87(4):443-7
- Balakrishnan M, Simmonds RS, Kilian M. Different bacteriocin activities of *S. Mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. J Med Microbiol. 2002 nov.;51(11):941-8.
- Caufield, PW. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. Pediatr Dent. 1997 Nov-Dec.;19(8):491-7.
- Caufield PW, et al. Distinct bacteriocin groups correlate with different groups of *Streptococcus mutans* plasmids. Infect Immun. 1985 Apr.;48(1):51-6.
- Fabio U, Bondi M, Manicardi G, Messi P, Neglia R. Production of bacteriocin-like substances by human oral streptococci. Microbiologica 1987 Oct.;10(4):363-70.
- Gold OC, Jordan HV, Van Houte, J. A selective medium for *S. mutans*. Arch. Oral Biol. 1973;18:1356-64.
- Gronroos L, Matto J, Saarela M, Luoma AR, Luoma H, Jousimies-Somer H, et al. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. Antimicrob. Agents Chemother. 1995 Apr.;39(4):894-8.
- 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. 1998;66:2595-600.
- Hamada S, Ooshima T. Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. J Dent Res. 1975 Jan./Fev.;54(1):140-5.
- Kamiya RU, Napimoga MH, Rosa RT, Hoffling JF, Goncalves R. Mutacin production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol Immunol. 2005;20:20-4.
- Kohler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J Clin Microbiol. 1979;9:584-8.
- Köhler B, Krasse, B. Human strains of mutans streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. Oral Microbiol Immunol. 1990 Aug.;5(4):177-80.
- Loesche WL. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986 Dec.;50(4):353-80.
- Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MP. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol. 2003 Jun.;18(3):144-9.
- Mattos-Graner Ro, Li Y, Caufield Pw, Duncan M, Smith DJ. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. J Clin Microbiol 2001;39:2313-6.
- Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa AR, Höfling JF, Mattos-Graner RO, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 2004;53:697-703.
- Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. J Oral Sci. 2005;47(2):59-64.
- Novak J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *S. mutans*. J Bacteriol. 1994;176:4316-20.
- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol. 2000 Aug.;15(4):258-62.
- Qi, F, Chen P, Caufield PW. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. Appl Environ Microbiol. 1999 Sep.;65(9):3880-7.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes. Appl Environ Microbiol 2000 Aug.;66(8):3221-9.
- Qi, F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol. 2001 Jan.;67(1):15-21.
- Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Kawato T, Tanaka H, Nakano Y, et al. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4107-12.
- Socransky S. S. Association between microbial species in subgingival plaque samples. Oral Microbiol Immunol. 1988 mar.;3(1):1-7.
- World Health Organization. Oral health surveys, basic methods. 4th ed. Geneva: OMS; 1997. p.66.

Recebido em 20/02/08

Aprovado em 25/04/08

Correspondência:

Regina Célia Poli-Frederico
 Av. Higienópolis, 1331- apto 1002
 Bairro Higienópolis - Londrina -PR
 CEP – 86015-010
 Email: reginafredeico@yahoo.com.br