



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que a aluna **Thais Harder da Palma RA 104162** esteve sob a minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **Análise do perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de Streptococcus pioneiras da cavidade bucal** no ano de **2013**.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pela aluna, como requisito para aprovação na disciplina DS833 – Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 20 de setembro de 2013.

Profa. Dr. Renata de Oliveira Mattos Graner
(Orientadora)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Análise do perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de
Streptococcus pioneiras da cavidade bucal.

*Analysis of the patterns of antibiotic sensitivity in pioneer strains of
Streptococci from the oral cavity.*

Thaís Harder de Palma

PIRACICABA, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE



Autora: Thaís Harder de Palma

Análise do perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de
Streptococcus pioneiras da cavidade bucal.

*Analysis of the patterns of antibiotic sensitivity in pioneer strains of
Streptococci from the oral cavity.*

ORIENTADORA: RENATA DE OLIVEIRA MATTOS-GRANER

PIRACICABA, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

P18a Palma, Thaís Harder de, 1990-
Análise do perfil de sensibilidade a antibióticos de
cepas de Streptococcus pioneiras da cavidade bucal /
Thaís Harder de Palma. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos Graner.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Resistência microbiana a medicamentos. 2.
Crianças. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira,
1971- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III.
Título.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais Angela e José, que me proporcionaram a realização desse sonho.

Agradecimento

Agradeço à FAPESP pelo financiamento da pesquisa possibilitando a sua execução.

Agradeço também a professora Renata de Oliveira Mattos Graner que me orientou nessa pesquisa com grande empenho e dedicação. Também colaborou para meu crescimento profissional a Dra. Margaret Duncan e toda sua equipe que me recebeu em seu laboratório no The Forsyth Institute.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório de microbiologia e imunologia, que sempre me estenderam as mãos e me ajudaram a conciliar a graduação com a iniciação científica.

Finalmente, agradeço o Fernando Bizzarro, uma pessoa muito especial que sempre esteve ao meu lado me incentivando e me ajudando.

Resumo

A cavidade bucal apresenta alta diversidade e densidade de microrganismos, os quais podem ser patogênicos sob condições específicas. Entre estes, *Streptococcus* ssp. não hemolíticos são predominantes nos diversos nichos bucais em adultos e crianças. Diversas espécies do gênero *Streptococcus* são pioneiras da cavidade bucal durante o estabelecimento da microbiota na infância e há evidências de que este grupo bacteriano influencie na maturação da microbiota bucal através de interações metabólicas e genéticas com outros microrganismos e com o hospedeiro. A alta densidade microbiana dos nichos ecológicos bucais favorece ainda a troca de informação genética intra- e interespecies. Através destas interações genes de resistência a antibióticos podem ser disseminados. Assim, o objetivo dessa pesquisa é caracterizar a sensibilidade de isolados pioneiros das principais espécies orais de estreptococos não-hemolíticos quanto à sensibilidade a diversos grupos de antibióticos. Para isto, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antibióticos amoxicilina, eritromicina, tetraciclina, doxiciclina, estreptomicina e penicilina G foram determinadas em 106 cepas isoladas de 21 crianças com 2 a 16 meses de idade, através do método de micro-diluição. Obtivemos um total de 632 testes (uma vez que toda cepa é testada em cada um dos 6 antibióticos e dois resultados precisaram ser descartados). Os resultados indicaram que a maioria das cepas testadas 64,5%, (n=408) apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados ao passo que 14,7% (n=93) e 20,7% (n=131) foram classificadas como com resistência intermediária ou resistência a uma ou mais drogas. Os dados obtidos são, portanto, consistentes com nossa hipótese inicial de que cepas de *Streptococcus* pioneiras da cavidade bucal de crianças poderiam apresentar resistência a antibióticos específicos, principalmente aos mais utilizados no combate a infecções comuns na infância.

Palavras-chave

Resistência a antibiótico, Microbiota bucal, crianças, *Streptococcus*.

Abstract

The oral microbiota is characterized by high amount and diversity of microorganisms, some of them may be pathogenic under specific environmental conditions. Non-hemolytic streptococcal species are predominant in most ecological niches of the mouth in adults and children. Several species of this genera are pioneer microorganisms of the mouth of young children and influence in the development of oral microbiota through metabolic and genetic interactions with other microorganisms, and through interactions with host factors. The high microbial density of the oral ecological niches increases the genetic exchanges among organisms, promoting for example, the spread of genes involved in antibiotic resistance. The aim of this project is to characterize the sensitivity to different antibiotics in pioneer streptococcal isolates of the oral cavity of babies, which were classified into the major taxonomic groups of non-hemolytic streptococci. To that purpose, the minimum inhibitory concentration (MIC) of amoxicillin, erythromycin, tetracycline, doxycycline, streptomycin and penicillin G will be determined in 106 strains, isolated from twenty four children with 2 to 16 months of age, using the micro-dilution method. The results indicated that most strains tested 64.5% (n = 408) showed sensitivity to all tested antibiotics whereas 14.7% (n = 93) and 20.7% (n = 131) were classified as resistance or intermediate resistance to one or more drugs. The data are therefore consistent with our initial hypothesis that strains of *Streptococcus* pioneering the oral cavity of children may exhibit resistance to specific antibiotics, especially those most used to fight common infections in childhood.

Keywords

Resistance to antibiotics, oral microbiota, children, *Streptococcus*.

Sumário

Dedicatória.....	4
Agradecimento	5
Resumo	6
Palavras-chave.....	6
Abstract	7
Keywords.....	7
1.Introdução.....	9
2. Revisão da literatura	10
3. Proposição.....	11
4. Material e métodos.....	11
4.1 Ensaio de determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para diferentes antibióticos.	13
5. Resultados.....	17
6. Discussão	18
7.Conclusão.....	19
Referências.....	20

1. Introdução

A cavidade bucal representa uma das superfícies do corpo com maior quantidade e diversidade de microrganismos (AAS *et al.*, 2008; KURAMITSU *et al.*, 2007; MARSH, 2003); estima-se que a microbiota bucal de adultos abrigue cerca de 700 espécies bacterianas ou filotipos (AAS *et al.*, 2008; PASTER *et al.*, 2001). Os dentes representam os principais nichos ecológicos responsáveis pela diversidade e densidade microbiana, porque os biofilmes formados sobre as superfícies dentárias são compostos por comunidades microbianas com alta densidade e complexidade (KURAMITSU *et al.*, 2007; MARSH, 2003). Há diversas evidências de que os principais patógenos bucais são adquiridos precocemente na infância durante as fases iniciais de colonização bucal (CAUFIELD *et al.*, 1993). Entretanto, há poucos estudos avaliando a composição e diversidade de espécies comensais durante as fases iniciais de estabelecimento da microbiota bucal.

Os microrganismos comensais da boca parecem ter papel importante na determinação do padrão de resposta imunológica durante as fases iniciais de colonização bucal (SMITH e TAUBMAN, 1995), o que pode influenciar significativamente na susceptibilidade individual às infecções por espécies patogênicas (NOGUEIRA *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2008). Estes são compostos especialmente por bactérias não-hemolíticas do gênero *Streptococcus* (SMITH e MATTOS-GRANER, 2008; CAUFIELD *et al.*, 2001).

Espécies de *Streptococcus* podem colonizar também outros sítios com alta carga microbiana, como o trato gastrointestinal (PARK *et al.*, 2005), e trato respiratório superior (BEK-THOMSEN *et al.*, 2008), o que reforça o papel importante de *Streptococcus spp.* no equilíbrio da microbiota normal de humanos.

Nesse trabalho buscamos caracterizar o perfil de sensibilidade de cepas de *Streptococcus* pioneiras da cavidade bucal frente aos antibióticos mais utilizados uma vez que a maioria das espécies de *Streptococcus* orais é naturalmente competente, e possivelmente contribuem para a transferência de material genético entre diversos componentes da microbiota humana (CVITKOVITCH, 2001), como sugerem as análises recentes do genoma de espécies como *Streptococcus mitis* (DENAPATE *et al.*, 2010). Assim, os genes de resistência a antibióticos podem ser disseminados e

mantidos entre microrganismos bucais (FACKLAM, 2002), ou mesmo entre microrganismos que colonizam outras regiões mucosas, como o trato respiratório superior e o trato gastrointestinal (DENAPAITE et al., 2010; SIMÕES et al., 2010; ROBERTS e MULLANY, 2010). Este fenômeno parece contribuir para o aumento da ocorrência de infecções de difícil controle na infância (DENAPAITE et al., 2010; SIMÕES et al., 2010).

2. Revisão da literatura

Na maioria das pessoas, bactérias do gênero *Streptococcus* são pioneiras nos diversos nichos ecológicos da boca, incluindo-se superfícies mucosas e superfícies dentárias, e permanecem predominantes na microbiota de adultos (AAS et al., 2008; DIAZ et al., 2006).

A alta densidade e diversidade microbiana nos nichos ecológicos bucais, e a capacidade de troca horizontal de material genético por diversas espécies microbianas destes nichos, através de transformação natural, conjugação e transdução contribuem para a disseminação de genes entre os microrganismos da cavidade bucal (FACKLAM, 2002). Este fenômeno explica em parte a grande dificuldade de classificação das espécies de estreptococos orais e a constante necessidade de alterações dos sistemas taxonômicos (FACKLAM, 2002).

Mais importante, as trocas genéticas contribuem para a disseminação de genes de virulência e de resistência a antibióticos (HANNAN et al., 2010). *Streptococcus* são naturalmente competentes, e podem ainda adquirir genes de resistência a tetraciclinas de outros gêneros do biofilme dental (*Veillonella spp.*), através de conjugação (HANNAN et al., 2010).

Há diversas evidências de que cepas *Streptococcus mitis* pioneiras da cavidade bucal têm estreita relação com *Streptococcus pneumoniae*, compartilhando genes de virulência como os codificadores de autolisinas (*lytA*), proteínas de superfície (*pcpA*, *pspA*, *pspC*) e hialuronidase (*hlyA*). A análise do genoma de cepa *S. mitis* B6 indica uma enorme capacidade de aquisição de genes de diversas espécies e gêneros microbianos, entre os quais predominam homólogos das espécies *S. salivarius* e *S. sanguinis*, indicando que a transmissão horizontal ocorre predominantemente na

microbiota bucal (DENAPAITE *et al.*, 2010). A cepa *S. mitis* B6 contém ainda genes de resistência à tetraciclina de transposons não comumente presentes em cepas tetraciclina-resistentes de *S. pneumoniae* e genes de resistência a aminoglicosídeos contidos em elementos genéticos comumente detectados em *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (DENAPAITE *et al.*, 2010), sugerindo que trocas genéticas ocorram entre *S. mitis* e outros gêneros bacterianos da microbiota respiratória e gastrointestinal.

Pressões seletivas que favoreçam a disseminação de genes de resistência entre espécies da microbiota da mucosa oral, digestória e respiratória superior, possivelmente incluem a administração de antibióticos para conter infecções do trato respiratório superior na infância (READY *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2010; DENAPAITE *et al.*, 2010). Há diversas evidências de que espécies de estreptococos pioneiras da cavidade bucal desempenhem funções de reserva e disseminação de genes de resistência a antibióticos na microbiota de humanos (SIMÕES *et al.*, 2010; READY *et al.*, 2004; GUEIMONDE *et al.*, 2006).

3. Proposição

O objetivo deste projeto é caracterizar a sensibilidade de isolados pioneiros das principais espécies orais de estreptococos não-hemolíticos quanto à sensibilidade a diversos grupos de antibióticos. Para isto, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antibióticos amoxicilina, eritromicina, tetraciclina, doxiciclina, estreptomicina e penicilina G foram determinadas em 106 cepas isoladas de 21 crianças com 2 a 16 meses de idade, através do método de micro-diluição.

4. Material e métodos

Todos os antibióticos foram adquiridos da Sigma, na forma liofilizada, os quais foram diluídos de acordo com o recomendado pelo fabricante. As soluções de antibióticos estão armazenadas a -20°C em microtubos de tipo Eppendorf contendo 400µL cada. As soluções são preservadas por um período máximo de 2 meses.

Foram incluídos neste estudo um total de 106 isolados obtidos de 21 crianças saudáveis com 2 a 16 meses de idade. Estas cepas de estreptococos foram isoladas

de amostras coletadas da mucosa bucal e/ou placa dental de crianças que participam do programa de prevenção de cárie dentária do Centro de Pesquisa e Atendimento Odontológico para Pacientes Especiais (CEPAE) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP/UNICAMP (protocolo 054/2010). A utilização de antibióticos em até um mês antes do exame e problemas de saúde sistêmicos ou bucais foram adotados como fatores de exclusão.

Estas crianças fazem parte da amostra estudada em dois projetos de bolsa de Iniciação Científica (FAPESP, Proc. 2010/06785-1 e Proc. 2010/06786-8) e os isolados foram identificados com base em sistema de classificação por PCR com pares de primers desenvolvido por Garnier *et al.* (1997), ou sequenciamento parcial do gene 16SRNA. A identidade da espécie dos isolados dos grupos Mitis e Sanguinis foram confirmada através do sequenciamento de genes *housekeeping sodA* (codificador da superóxido-dismutase dependente de manganês) e *ddl* (codificador de D-alanina:D-alanina ligase) (FAPESP Proc. 2010/06786-8).

A Tabela 1 mostra a distribuição dos isolados de cada espécie ou grupo taxonômico, segundo a faixa etária das crianças testadas nessa pesquisa.

Tabela 1. Distribuição dos isolados desta pesquisa segundo a identificação taxonômica e faixa etária das crianças hospedeiras.

Faixa etária das crianças em meses						
Espécie ou grupo	(n)					TOTAL
	2-4 (4)	5-7 (2)	8-10 (6)	11-13 (9)	14-16 (3)	
<i>Streptococcus mitis</i>	2	0	4	0	0	6
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	0	0	3	0	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	31	3	11	37	15	97
TOTAL	33	3	15	40	15	106

Em todos os ensaios, foram utilizadas como controles, as cepas *S. sanguinis* SK36 (ATCC BAA-1455), *S. mitis* NCTC 12261 (ATCC 49456), *S. oralis* INCQS 00470 (ATCC 10557), *S. salivarius* INCQS 00457 (NCTC 8618 / ATCC 7073). Estoques congelados de cada cepa estão armazenados a -70°C em Skim Milk (Difco). Para obtenção dos estoques bacterianos de trabalho utilizados nessa pesquisa, descongelamos os estoques preparados pela pesquisa acima citada e os cultivamos em Ágar Mitis Salivarius (MSA) em 10% de CO₂, a 37°C, por 24h. Em seguida,

colônias bacterianas foram transferidas para microtubos do tipo Eppendorf contendo Skim Milk (Difco) permanecendo armazenados a -20°C.

4.1 Ensaios de determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para diferentes antibióticos.

As CIMs dos antibióticos Penicilina G, Amoxicilina, Eritromicina, Doxíciclina/Tetraciclina e Estreptomicina foram determinadas nos isolados clínicos, utilizando-se para cada experimento as cepas de referência como controle. Os ensaios foram realizados segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M7-A6, 6ª Ed.). Foi definida como CIM, a mínima concentração de cada droga capaz de inibir o crescimento visualmente detectável. A Tabela 2 resume as concentrações testadas para cada antibiótico (HORODNICEANU *et al.*, 1982; WALKER *et al.*, 2000; HANSLIK *et al.*, 2003; BANCESCU *et al.*, 2004).

Tabela 2. Concentrações de antibióticos a serem testadas para a determinação das concentrações inibitórias mínimas

Antibióticos	Concentrações a serem testadas (µg/mL)
Beta lactâmicos:	
Penicilina G	8,0 a 0,016
Amoxicilina	8,0 a 0,016
Tetraciclinas:	
Doxíciclina	64,0 a 0,12
Tetraciclina	64,0 a 0,12
Macrolídeos:	
Eritromicina	8,0 a 0,016
Aminoglicosídeos:	
Estreptomicina	4000,0 a 7,8

Para isso, utilizamos o método de microdiluição em placas de microtitulação de 96 poços. 100µl de caldo BHI estéril foram distribuídos em todos os poços da placa, com auxílio de uma micropipeta multicanal (8 canais). Após isso, 100µl de uma solução do antibiótico em BHI foram depositados na coluna 1, onde foi homogeneizada por pipetagem. A seguir, 100µl do conteúdo dos poços da coluna 1 foram transferidos para os poços da coluna seguinte. O processo foi repetido até a coluna 10, objetivando a diluição 1:2 em cada coluna subsequente, de modo a se obter uma concentração decrescente da droga da coluna 1 à coluna 10. Os 100µl

finais obtidos da coluna 10 foram desprezados. O inóculo bacteriano, diluído em 100µl, foi então acrescentado aos poços.

Para preparo do inóculo, as cepas testadas foram reativadas em placas de MSA (37°C; 10%CO₂; 24h) (figura 1). Colônias isoladas de cada cepa (figura 2) foram transferidas para caldo BHI (4ml) e incubadas durante 24h. Após crescimento (figura 3), as culturas de cada cepa foram ajustadas para uma absorbância a 550nm (A_{550nm}) igual a 1,0. As culturas bacterianas foram então diluídas 1:20 em meio BHI estéril e volumes de 100µl destas diluições transferidos para os poços da cada placa. Como controle positivo do crescimento microbiano, a coluna 11 recebeu meio de cultura sem antibiótico e o mesmo número de bactérias. Como controle negativo do ensaio, a coluna 12 conteve 200µl de meio de cultura estéril, não devendo apresentar crescimento. Cepas de referência (ATCC) foram incluídas nos ensaios. As placas foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 10% CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24h. Após este período, o crescimento ou a inibição foram observados visualmente (figura 4). A interpretação do teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizada de acordo com a publicação CLSI M100-S15 (2005). As cepas foram classificadas em categoria Sensível, Intermediário ou Resistente (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios para determinação da sensibilidade a antibióticos através do método de microdiluição em caldo

Antibióticos	Concentrações (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Penicilina G ^A	≤ 0,25	0,5 a 2	≥ 4
Amoxicilina ^A	≤ 0,25	0,5 a 2	≥ 4
Doxiciclina ^A	≤ 2	4	≥ 8
Tetraciclina ^A	≤ 2	4	≥ 8
Eritromicina ^A	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Estreptomicina ^B	≤250	500 a 1000	≥ 2000

Fonte: CLSI M100-S15 (2005)

As figuras abaixo mostram a sequência de realização do ensaio de concentração inibitória mínima

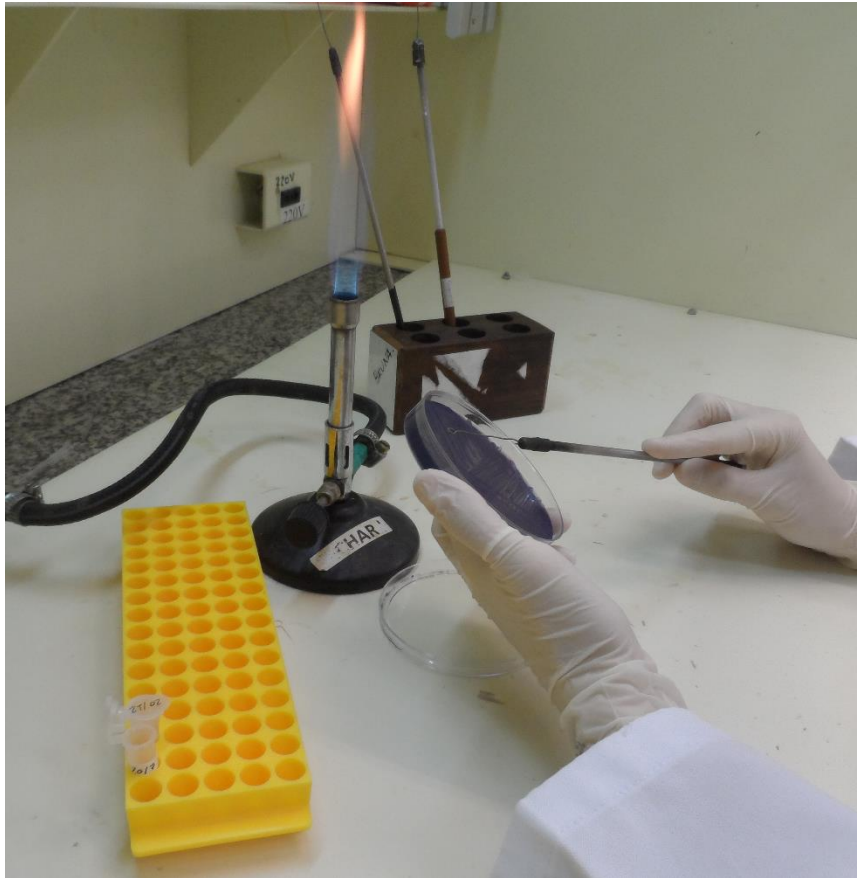


Figura 1. Reativação das cepas em placa de MSA.

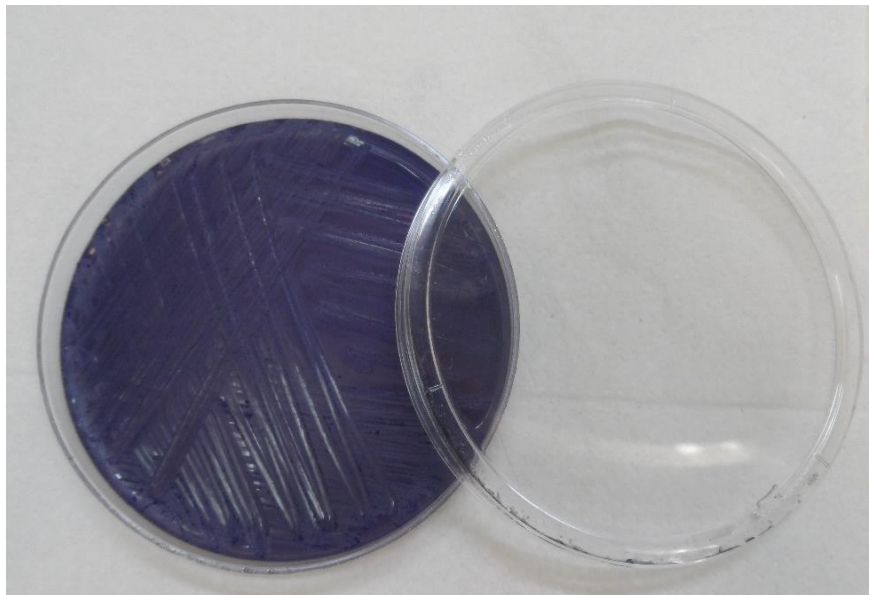


Figura 2. Crescimento em placa de MSA após 24 horas de incubação a 37°C; 10% CO₂. As colônias isoladas foram transferidas para caldo de BHI.

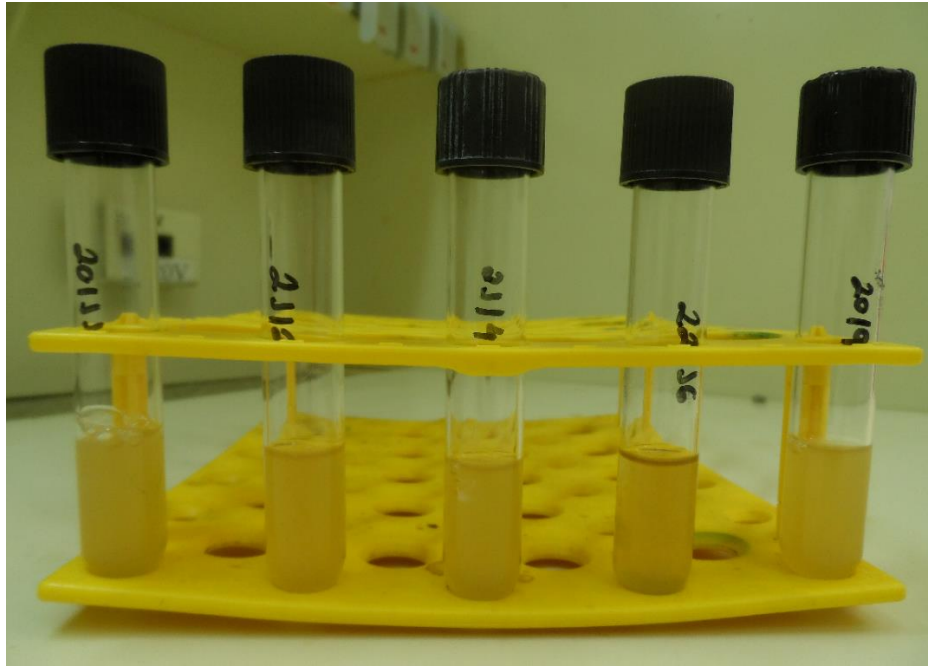


Figura 3. Crescimento microbiano em caldo de BHI após 24 horas de incubação.

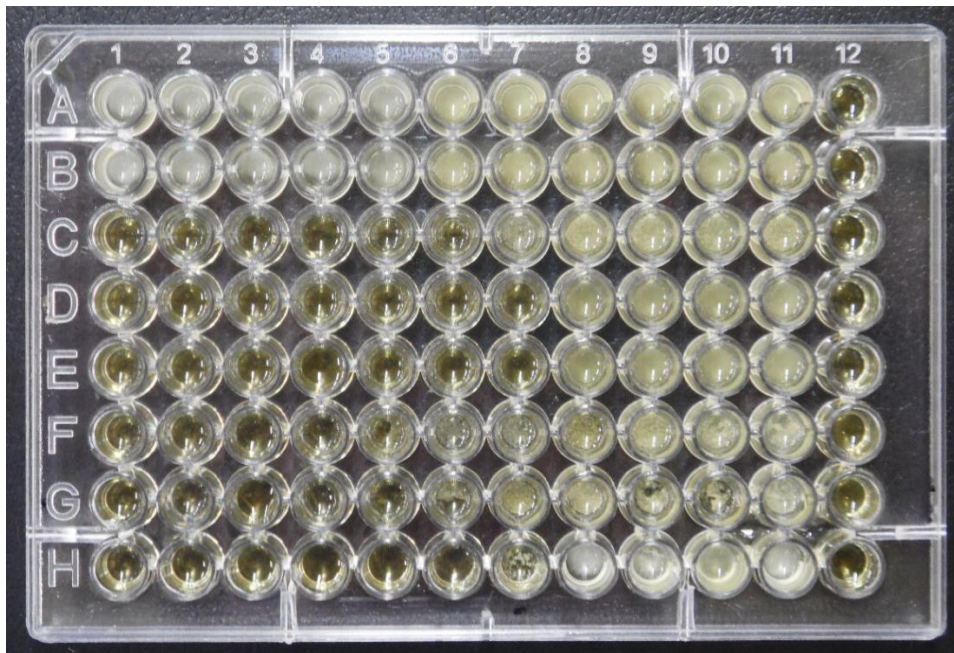


Figura 4. Placa de microdiluição após 24 horas de incubação a 37°C, atmosfera de 10% CO₂. Após este período, o crescimento ou a inibição puderam ser observados.

5. Resultados

Foram testados 106 isolados nos antibióticos do grupo penicilinas, macrolídeos, tetraciclina, doxiciclina e aminoglicosídeo de 21 crianças, obtendo dessa forma um total de 632 testes (uma vez que toda cepa é testada em cada um dos 6 antibióticos).

Essas 106 cepas pertencem a 3 grupos taxonômicos; seis da espécie *S. mitis*, 97 *S. salivarius* e 3 *S. sanguinis*. A média de idade das crianças cujas cepas foram testadas é de 9,3 meses. Apresentamos os resultados dos testes na tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos isolados por espécie e sensibilidade aos antibióticos

Antibióticos	<i>S. mitis</i>			<i>S. salivarius</i>			<i>S. sanguinis</i>			Total
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
Doxiciclina	5			75	8	13	3			104
Tetraciclina	6			71	6	20	3			106
PenG	5		1	47	37	13		2	1	106
Amoxicilina	5			61	29	6		3		104
Estreptomicina	6			93	4		3			106
Eritromicina		2	4	24	2	71	1		2	106

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

Obs: duas cepas tiveram seus resultados descartados uma no antibiótico Doxiciclina e outra na Amoxicilina devido a contaminação.

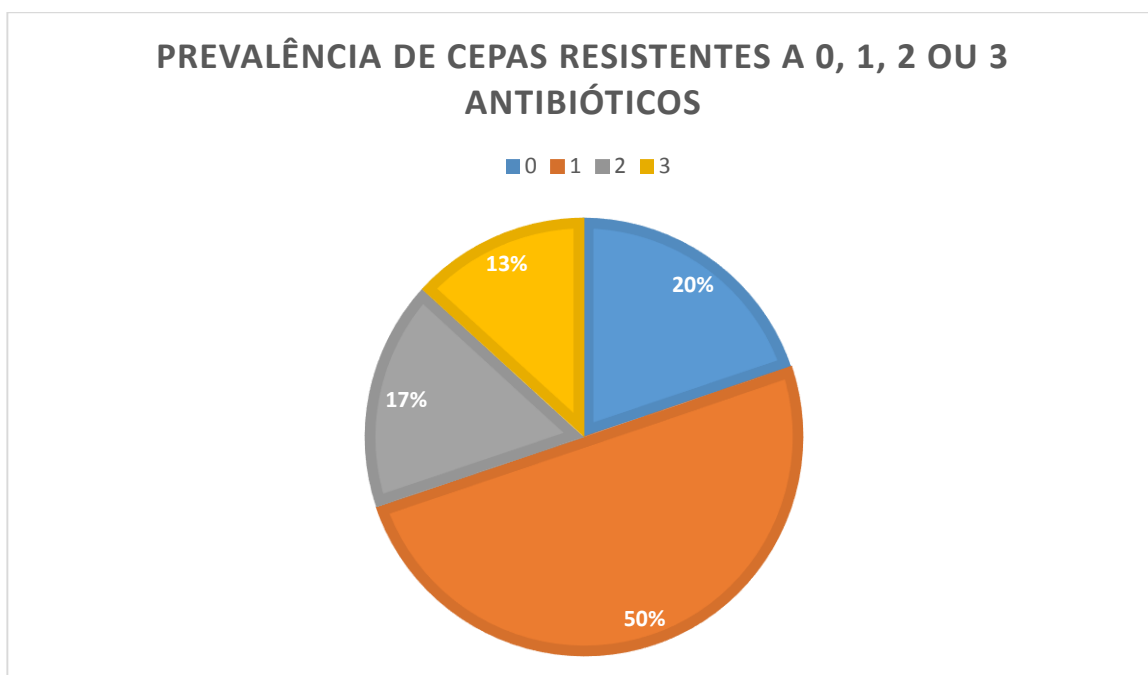
Os dados da Tabela 4 mostram que a maioria das cepas testadas 64,5%, (n=408) apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados ao passo que 14,7% (n=93) e 20,7% (n=131) foram classificadas respectivamente como com resistência intermediária ou resistência a uma ou mais drogas.

Analisando os resultados para cada antibiótico isoladamente, é possível constatar que a Eritromicina, foi a droga à qual houve maior número de cepas resistentes 72,6% (n=77 das cepas testadas), comparada aos outros antibióticos. À PenG, 49% (n=52) das cepas apresentaram sensibilidade e 36,8% (n=39) resistência intermediária. Quanto à Doxiciclina, 79,8% (n=83) das cepas apresentaram sensibilidade, resultado semelhante ao obtido para a Tetraciclina, 75,5% (n=80) de cepas sensíveis. Da mesma forma, 96,2% (n=102) das cepas testadas com

Estreptomicina foram consideradas sensíveis pelos testes de CIM e 3,8% (n=4) apresentaram resistência intermediária a esse antibiótico. A Estreptomicina foi o único dos antibióticos ao qual nenhuma cepa apresentou resistência. No antibiótico Amoxicilina, 63,5% (n=66) das cepas apresentaram sensibilidade e 30,8% (n=32) demonstraram resistência intermediária.

Além dos dados mostrados acima, pudemos observar que das 21 crianças estudadas 11 (52,3%) apresentaram cepas resistentes a 2 ou mais antibióticos indicando que essas cepas apresentam um fenótipo de multirresistência.

O gráfico abaixo mostra a prevalência de cepas resistentes. Nele é possível observar que 30% das cepas testadas apresentaram um fenótipo de multirresistência.



6. Discussão

A significativa presença de cepas resistentes encontradas, principalmente na Eritromicina, é compatível com achados da literatura que tem apontado os estreptococos como o grupo bacteriano mais frequentemente resistente às drogas encontrado em crianças (ROBERTS e MULLANY, 2010).

Da mesma forma, nossos resultados se assemelham aos resultados de testes de resistência realizados por Ready *et al* (2003), que apontam a Eritromicina como um dos antibióticos aos quais as cepas de estreptococos são mais resistentes. Contudo, nossos resultados sobre sensibilidade às tetraciclinas diferem dessa literatura. Da mesma forma, Ready *et al* (2003) e Roberts e Mullany (2010) apontam elevada resistência dos estreptococos a tetraciclina, o mesmo não sendo observado no nosso trabalho. Os resultados da tabela 4 apontam que a maioria dos isolados testados foi considerada sensível à tetraciclina.

Os dados obtidos são, portanto, consistentes com nossa hipótese inicial de que cepas de *Streptococcus* pioneiras da cavidade bucal de crianças poderiam apresentar resistência a antibióticos específicos, principalmente aos mais utilizados no combate a infecções comuns na infância.

A presença de cepas multirresistentes reforça essa conclusão, evidenciando que esses antibióticos podem de fato estar relacionados com o desenvolvimento de cepas resistentes nas crianças testadas. Contudo, as contradições encontradas entre nossos resultados e alguns dos resultados presentes na literatura também apontam a necessidade de aprofundar a compreensão do fenômeno da resistência antibiótica em cepas de crianças como as aqui analisadas.

7. Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que na população estudada de crianças saudáveis com 6 e 12 meses de idade:

- 1) Há uma grande prevalência de cepas bucais de *Streptococcus spp.* resistentes a um ou mais antibióticos entre crianças saudáveis com 2 a 16 meses de idade
- 2) Cerca de 52,3 % das crianças albergam cepas de *Streptococcus spp.* multirresistentes, isto é resistentes a dois ou mais antibióticos.
- 3) A espécie *Streptococcus salivarius* comumente apresenta fenótipo de resistência a múltiplas classes de antibióticos.

Referências

- AAS, J. A., GRIFFEN, A. L., DARDIS, S. R., LEE, A. M., OLSEN, I., DEWHIRST, F. E., LEYS, E. J., PASTER, B. J.. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J.Clin.Microbiol.* 46:1407-1417.
- BANCESCU, G., DUMITRIU, S., BANCESCU, A., DEFTA, C., PANA, M., IONESCU, D., ALECU, S., ZAMFIRESCU, M.. (2004). susceptibility testing of *Streptococcus mitis* group isolates. *Indian J Med Res. May*;119 Suppl:257-61.
- BEK-THOMSEN, M., TETTELIN, H., HANCE, I., NELSON, K. E., KILIAN, M.. (2008). Population diversity and dynamics of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus infantis* in the upper respiratory tracts of adults, determined by a nonculture strategy. *Infect.Immun.* 76:1889-1896.
- CAUFIELD, P. W., CUTTER, G. R., DASANAYAKE, A. P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 72, 37–45.
- CLSI-NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)
- CLSI-NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
- CVITKOVITCH, D. G.. Genetic competence and transformation in oral streptococci. (2001). *Crit Rev Oral Biol Med.*12(3):217-43.
- DENAPAITE, D., BRÜCKNER, R., NUHN, M., REICHMANN, P., HENRICH, B., MAURER, P., SCHÄHLE, Y., SELBMANN, P., ZIMMERMANN, W., WAMBUTT, R., HAKENBECK, R.. (2010). The genome of *Streptococcus mitis* B6--what is a commensal? *PLoS One.* Feb 25;5(2):e9426.

DIAZ, P. I., CHALMERS, N. I., RICKARD, A. H., KONG, C., MILBURN, C. L., PALMER JR, R. J., KOLENBRANDER, P. E.. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl.Environ.Microbiol.* 72:2837-2848.

FACKLAM, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin.Microbiol.Rev.* 15:613-630.

GARNIER, F., GERBAUD, G., COURVALIN, P., GALIMAND, M.. (1997). Identification of clinically relevant viridans group streptococci to the species level by PCR. *J.Clin.Microbiol.* 35:2337-2341.

GUEIMONDE, M., SALMINEN, S., ISOLAURI, E.. (2006). Presence of specific antibiotic (tet) resistance genes in infant faecal microbiota. *FEMS immunology and medical microbiology*, 48(1): 21-5

HANNAN, S., READY, D., JASNI, A. S., ROGERS, M., PRATTEN, J., ROBERTS, A. P.. (2010) Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Aug;59(3):345-9

HANSLIK, T., HARTIG, C., JURAND, C., ARMAND-LEFEVRE, L., JUBAULT, V., ROUVEIX, E., DUBOURG, O., PRINSEAU, J., BAGLIN, A., NICOLAS-CHANOINE, M.H.. (2003). Clinical significance of tolerant strains of streptococci in adults with infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* Aug;9(8):852-7.

HORODNICEANU, T., BUU-HOÏ, A., DELBOS, F., BIETH, G.. (1982.). High-level aminoglycoside resistance in group A, B, G, D (*Streptococcus bovis*), and viridans streptococci. *Antimicrob Agents Chemother.* January; 21(1): 176–179.

KURAMITSU, H. K., HE, X., LUX, P., ANDERSON, M. H., SHI, W.. (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 71:653-670.

MARSH, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149:279-294.

NOGUEIRA, R. D., ALVES, A. C., KING, W. F., GONCALVES, R. B., HOFLING, J. F., SMITH, D. J., MATTOS-GRANER, R. O.. (2007). Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. *Clin.Vaccine Immunol.* 14:804-807.

NOGUEIRA, R. D., ALVES, A. C., NAPIMOGA, M. H., SMITH, D. J., MATTOS-GRANER, R. O.. (2005). Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect.Immun.* 73:5675-5684.

NOGUEIRA, R. D., KING, W. F., GUNDA, G., CULSHAW, S., TAUBMAN, M. A., MATTOS-GRANER, R. O., SMITH, D. J.. (2008). Mutans streptococcal infection induces salivary antibody to virulence proteins and associated functional domains. *Infect.Immun.* 76:3606-3613.

PARK, H. K., SHIM, S. S., KIM, S. Y., PARK, J. H., PARK, S. E., KIM, H. J., KANG, B. C., KIM, C. M.. (2005). Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J.Microbiol.* 43:345-353.

PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., ERICSON, R. E., LAU, C. N., LEVANOS, V. A., SAHASRABUDHE, A., DEWHIRST, F. E.. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J.Bacteriol.* 183:3770-3783.

READY, D., BEDI R, SPRATT DA, MULLANY P, WILSON M. (2003).Prevalence, proportions, and identities of antibiotic-resistant bacteria in the oral microflora of healthy children. *Microb. Drug Resist.* 9, 367–372

READY, D., LANCASTER, H., QURESHI, F., BEDI, R., MULLANY, P., WILSON, M. (2004). Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug;48(8):2883-7

ROBERTS, A. P., MULLANY, P. (2010). Oral biofilms: a reservoir of transferable bacterial antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* Dec; 8(12): 1441-50

SIMÕES, A.S., SÁ-LEÃO, R., ELEVELD, MJ., TAVARES, D. A., CARRIÇO, J. A., BOOTSMA, H. J., HERMANS, P. W..(2010). Highly penicillin-resistant multidrug-resistant pneumococcus-like

strains colonizing children in Oeiras, Portugal: genomic characteristics and implications for surveillance. *J Clin Microbiol.* Jan;48(1):238-46.

SMITH, D. J., MATTOS-GRANER, R. O.. (2008). Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 319:131-156.

SMITH, D. J., TAUBMAN, M. A.. (1995). Development of salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens associated with virulence. *Adv.Exp.Med.Biol.* 371B:1141-1143.

WALKER, C. B., GODOWSKI, K.C., BORDEN, L., LENNON, J., NANGÓ, S., STONE, C., GARRETT, S..(2000). The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. *J Periodontol.* May;71(5):768-74.

VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo	2011/09761-9
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação	Em Execução
Vigência	01/02/2012 a 31/12/2013
Beneficiário	Thaís Harder de Palma
Responsável	Renata de Oliveira Mattos Graner
Vínculo Institucional do Processo	Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP
Área de Alocação de Recursos	Saúde

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em / por: 30/03/2013 Carlos Henrique de Brito Cruz

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
SM 002 - Renovação de Bolsa	13/11/2012	Concedido
Relatório Científico 2	14/11/2012	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Informamos que a FAPESP aprovou o Relatório Científico e a sua solicitação de renovação da bolsa, em conformidade com as cláusulas e condições constantes do Termo de Prorrogação.

Para conhecimento do conteúdo do despacho, V.S.a deve acessar o Sistema SAGe (www.fapesp.br./sage), clicar no item do menu Meus Processos>>Número do Processo e, em Mais Informações, escolher a opção "Despacho".

Por favor, para qualquer consulta ou comunicação sobre esta correspondência, use exclusivamente os serviços do "Converse com a FAPESP" em www.fapesp.br/converse

Observações:

1- A transcrição do parecer está disponível exclusivamente para o orientador, sendo de sua responsabilidade escolher os trechos a serem compartilhados com o candidato.

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz

Diretor Científico

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer do Relatório Científico

O relatório está claro e bem detalhado. Os autores desenvolveram grande parte do proposto no projeto inicial. Não finalizaram uma pequena parte em função de um problema com o lote de amoxicilina. A proposta para o prosseguimento do projeto e renovação da bolsa são pertinentes. Essa assessoria entende que as justificativas apontadas pelos autores (beneficiário e responsável) são adequadas para a renovação. Algumas sugestões: Na última linha da página 12 tem um erro de digitação. O Formulário de Acompanhamento deve ser preenchido com maior atenção, uma vez que alguns itens estão incorretos ou não foram preenchidos.

Avaliação

Para Relatório DE PROGRESSO

Etapa cumprida no relatório apresentado

- ☐ Ótimo
- ☒ Bom
- ☐ Regular
- ☐ Fraco

Programa de trabalho para a próxima etapa

- ☐ Ótimo
- ☒ Bom
- ☐ Regular
- ☐ Fraco

Para Relatório FINAL

Em relação à proposta inicial os resultados obtidos estão:

- ☐ Acima das expectativas
- ☒ Dentro das expectativas
- ☐ Aquém das expectativas
- ☐ Muito aquém das expectativas

Parecer da solicitação de alteração de concessão (SM)

Os autores desenvolveram grande parte do proposto no projeto inicial. Não finalizaram uma pequena parte em função de um problema com o lote de amoxicilina. A proposta para o prosseguimento do projeto (com repetição de alguns testes e novos testes) e renovação da bolsa são pertinentes. Essa assessoria entende que as justificativas apontadas pelos autores (beneficiário e responsável) são adequadas para a renovação.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 2 (Aprovado)

Compromisso	10/02/2013
Período Relacionado	10/06/2012 a 31/12/2012
Situação	Atendido

VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo 2011/09761-9
Linha de Fomento Programas Regulares / Bolsas / No País / Iniciação Científica - Fluxo Contínuo
Situação Em Execução
Vigência 01/02/2012 a 31/12/2013
Beneficiário Thaís Harder de Palma
Responsável Renata de Oliveira Mattos Graner
Vínculo Institucional do Processo Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP
Área de Alocação de Recursos Saúde

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em / por: 08/08/2013 Alessandra Mendes Diosdado

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 3	11/06/2013	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Prezado(a) Prof(a) Dr(a),

Comunicamos que o Relatório Científico de Progresso da bolsa em questão foi preliminarmente analisado pela Coordenação de Área da FAPESP. O Relatório Científico de Progresso será encaminhado juntamente com o Relatório Científico Final para análise e emissão do parecer da assessoria, conforme normas para Relatório Científico de Iniciação Científica disponível em <http://www.fapesp.br/248#258>

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico - FAPESP

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Não há transcrição associada.

Frases para Termo de Outorga

Não há frases associadas.

Relatório Científico 3 (Aprovado)

Compromisso	10/06/2013
Período Relacionado	01/02/2013 a 10/06/2013
Situação	Atendido



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise filogenética de cepas Streptococcus dos grupos Mitis e Sanguinis isolados da cavidade bucal de crianças durante as fases iniciais de colonização"**, protocolo nº 054/2010, dos pesquisadores Renata de Oliveira Mattos Graner e Jéssica Dias Theobaldo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/07/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Phylogenetic diversity of the genus Mitis and Sanguinis isolated from young infants oral cavity"**, register number 054/2010, of Renata de Oliveira Mattos Graner and Jéssica Dias Theobaldo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/02/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP