



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

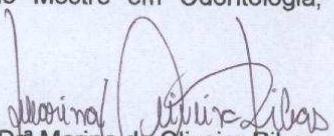
TERMO DE APROVAÇÃO

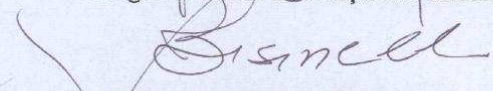
LISIANE CÂNDIDO

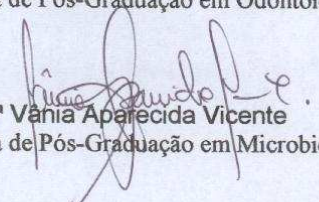
AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO NA EXPERIÊNCIA DE DOENÇA CÁRIE EM PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador (a):


Profª Drª Marina de Oliveira Ribas
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Júlio César Bisinelli
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Vânia Aparecida Vicente
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, UFPR

Curitiba, 03 de abril de 2009.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO NA EXPERIÊNCIA DE DOENÇA CÁRIE EM
PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI

CURITIBA
2009

LISIANE CÂNDIDO

AVALIAÇÃO DE FATORES DE RISCO NA EXPERIÊNCIA DE DOENÇA CÁRIE EM
PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração - Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marina de Oliveira Ribas

CURITIBA
2009

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

C217a
2009 Cândia, Lisiane
Avaliação de fatores de risco na experiência de doença de cárie em
pacientes portadores de anemia de Fanconi / Lisiane Cândia ; orientadora,
Marina de Oliveira Ribas. – 2009.
77 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2009
Bibliografia: f. 74-77

1. Cáries dentárias. 2. Anemia de Fanconi. 3. Manifestações orais de
doenças. I. Ribas, Marina de Oliveira. II. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.67

À Deus pelo dom da vida.....

Aos meus queridos familiares, cada um de vocês com um diferente grau de importância ao longo da minha jornada....

A minha mãe – Jucélia Nunes – pela força, compreensão, participação em todos os meus momentos (os bons e os difíceis), pelos conselhos, pela oportunidade de seguir os meus sonhos e conquistá-los a cada dia. Pelo exemplo de “ser mulher, mãe e amiga” por sempre ter permitido com estímulo de “vitória” nas minhas jornadas: acadêmicas, matrimonial e agora maternal. Por não ter deixado eu desistir nunca de estudar (até naquela aula de inglês...). Por ter dito “não” na hora certa e até por ter errado, pois não existe mãe que acerta todo o tempo. Eu te amo muito e a minha mãe é a melhor do mundo, se eu for pra minha filha metade da mãe que você é pra mim, serei vitoriosa na minha jornada de “ser mãe”. Obrigada por ter me dado a vida e fazer parte dela!

Eduardo, meu amor, meu amado, meu querido, meu anjo, meu tudo, meu lindo... obrigada por estar do meu lado, por participar dos meus maiores sonhos – meu mestrado e nossa filha. Por nunca ter desistido de investir no meu conhecimento, por ser companheiro, compreensivo, carinhoso e amigo. Por ter aberto mão dos teus sonhos pela realização dos meus. Por ser meu marido... Obrigada por fazer parte da minha vida....

Te quero pra sempre – Te amo pra sempre!!

Aos meus irmãos: Jairo e Luciane, pelo estímulo acadêmico, ser educador é um dom e vocês me ensinaram a valorizar e reconhecer este dom. Obrigada por terem sempre feito parte da minha existência, meus manos queridos. Mesmo distantes, o amor de vocês é constante na minha vida. Obrigada pelo caráter, seriedade e amizade que vocês sempre me transmitiram. Amo vocês!!

Ao meu pai Índio Cândido e a Elenara, obrigada por participarem, mesmo que distantes, dos meus momentos acadêmicos. Pelos estímulos e carinho. Pelas conversas de MSN e pelo apoio na carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Professora Doutora Marina de Oliveira Ribas, pela sua competência e paciência durante estes dois anos de orientação. Tens meu respeito e admiração. Obrigada pela oportunidade de aprendizagem tanto em sala de aula, no laboratório, quanto no HC, oportunidade de lidar com a novidade (Anemia de Fanconi), obrigada inclusive pelas críticas, por ter me tornado um ser humano mais forte e preparado para o mercado de trabalho. Obrigada pelo amor que tens pela ciência e pela arte de exercer nossa profissão. Seus exemplos eu levarei para o meu dia-a-dia.

À Professora Doutora Vânia Aparecida Vicente pela oportunidade de ter realizado o experimento nas dependências da UFPR – LABMICRO e BIOMOL. Obrigada pela co-orientação e pelo compromisso comigo, mesmo sendo uma colaboradora. Obrigada pela oportunidade de aprendizagem e pelo meu crescimento profissional. Tens minha admiração e respeito.

AGRADECIMENTOS

As professoras que ao longo da minha vida acadêmica foram fundamentais pra minha formação profissional e pessoal, professoras da UFSC que me ensinaram o amor a Estomatologia e a Patologia Bucal – Liliane Janete Grando, Denise Maria Belliard Oleiniski e Naira Mascarenhas Baratieri – muito obrigada por terem feito parte da minha vida, vou levá-las para sempre como exemplo profissional a ser seguido.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela oportunidade, a CAPES pelo financiamento do Mestrado tão sonhado e a Fundação Araucária pelo fomento a pesquisa.

Aos professores: Antônio Adilson Soares de Lima, Maria Ângela Naval Machado e Ana Trindade Grégio pela oportunidade e confiança durante minhas aulas em suas turmas de graduação.

Aos professores Wilson Denis Martins, Maria Ângela Naval Machado e Antônio Adilson Soares de Lima pela oportunidade de aprender “como ensinar” aos meus futuros alunos. Vocês foram grandes mestres e eu levarei este exemplo ao longo da minha vida docente.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação – Área de Concentração em Estomatologia pela oportunidade de crescimento e conhecimento científico.

Ao professor Sérgio Aparecido Ignácio pela paciência e disponibilidade para análises de resultados e procedimentos estatísticos.

Aos colegas do mestrado, Adriane, Eli, Maitê e Soraya. Aos colegas do doutorado Alessandra, Lauren, Acir, Sheila, Ivana, Mônica, Magna, Cíntia, Rosana, Fernando, Tatiane Agradeço especialmente à Carla e Lúcia, pois são muito mais que colegas, tornaram-se mais que amigas, comadres, confidentes.... Vocês estarão pra sempre em meu coração.

Aos colegas do Labmicro pela receptividade não só no laboratório, mas principalmente na sua “turma” com muito carinho e amizade: Eduardo, Samarina, Francine, Ângela, Juliana, Fernanda, Raquel, Diogo, Paulo e Mônica. Aos amigos do Departamento de Patologia Básica da UFPR – Professoras Cristina e Adriana sempre atenciosas e carinhosas, aos colegas Juliana, Giusepe, Guilherme, Jessé e Franciele.

A secretária do Programa de Pós-Graduação PUCPR – Neide Borges dos Reis pela sua atenção, carinho, disponibilidade, amizade e alegria.

As funcionárias das clínicas: Maria, Shirlei e Nilce, a Kassandra e a Leonor por sempre terem me tratado com o maior carinho e educação nas nossas inúmeras conversas “de corredor”. Aos funcionários da esterelização, demais funcionárias das clínicas, aos funcionários da secretaria, as funcionárias da limpeza, aos meninos do CAT e ao Manolo, meu enorme agradecimento pela cooperação de vocês no funcionamento das Clínicas Odontológicas da PUCPR, sem vocês, nada funcionaria.

As gurias do Laboratório de Patologia Experimental – Ana Paula, Marina e Camila pelos momentos de alegria e amizade que tivemos juntas (almoços, sorvetes....), vocês vão morar pra sempre em meu coração.

Ao Hospital de Clínicas da UFPR pela oportunidade de ter realizado este trabalho nas dependências do Departamento de Hematologia Pediátrica. Agradecimento especial a Marlene, assistente social do HC. Aos pacientes portadores de Anemia de Fanconi e seus familiares pelo desprendimento e concordância na realização desta pesquisa. Ao corpo clínico, Dra. Carmem Bonfim, Dr. Pasquini, Dr. Marco Antônio e Dr. Zanis Neto do Depto. De Hematologia Pediátrica e TMO pela permissão da realização da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram pela realização do meu grande sonho acadêmico.

Muito Obrigada e que Deus sempre os abençoe!!!

RESUMO

OBJETIVOS: Avaliar e correlacionar fatores de risco à doença cárie, como dieta, higienização bucal e microbiota bucal potencialmente cariogênica (*Streptococcus mutans*) com experiência de doença cárie por meio de levantamento de índice CPO-D/ ceo-d em pacientes portadores de anemia de Fanconi. **MATERIAL E MÉTODO:** A casuística foi composta por 31 pacientes portadores de anemia de Fanconi, com idades entre 4 e 20 anos. Foram aplicados questionários, com dados a respeito de dieta, higiene bucal e ações de prevenção para a doença cárie. Colheu-se saliva para isolamento de estreptococos do grupo mutans. Realizaram-se exames clínicos e levantamento dos índices bucais. Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva estatística: teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov, teste de Levene para igualdade das variâncias, U de Mann-Whitney, Qui-Quadrado, teste de correlação de Spearman e teste de diferença entre duas proporções para $p \leq 0,05$. **RESULTADOS e DISCUSSÃO:** Microrganismos potencialmente cariogênicos do grupo mutans estão presentes em proporções menores quando comparados com as outras espécies encontradas na microbiota bucal, como colonizadores primários e microrganismos potencialmente periodontopatógenos. Os indivíduos portadores de AF demonstraram índices CPO-D / ceo-d baixos, apesar da presença de fatores locais favoráveis ao desenvolvimento da doença cárie. **CONCLUSÃO:** Os pacientes portadores de anemia de Fanconi da casuística estudada apresentaram fatores de risco ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença cárie. Entretanto, os índices CPO-D, IHO-S foram baixos, bem como baixa a contagem de unidades formadoras de colônias de Estreptococos do grupo mutans por mL de saliva. Parece lícito concluir que os pacientes portadores de anemia de Fanconi não apresentam susceptibilidade aumentada à doença cárie.

ABSTRACT

OBJECTIVES: This study was aimed to evaluate and to correlate risk factors for the caries disease with caries experiences by DMFT / dmft index in patients presenting with Fanconi's anemia (FA). **MATERIAL AND METHOD:** 31 FA patients aged between 4 to 20 were examined. Questionnaires about sugar ingestion habits, hygiene habits and prevention actions for caries diseases were applied. Saliva was collected for *Streptococci mutans* isolation; clinical oral examination for obtention of oral index was performed. The data were submitted to statistics analysis. **RESULTS AND DISCUSSION:** The microbiological results show the mutans group present in a lower proportion when compared to another species of the oral microbiota in the group of FA patients. FA patients showed lower DMFT / dmft, although presenting some local risk factors for caries development. **CONCLUSION:** The studied group of Fanconi's anemia presented some local risk factors for caries disease development. However, they presented lower oral indexes and lower colonies count of *mutans* group. Considering the limits of this research and the applied methodology, it's possible to conclude that the Fanconi's anemia patients do not present higher susceptibility to caries disease.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 METODOLOGIA	11
DELINEAMENTO DA PESQUISA	11
EXAME CLÍNICO	12
COLETA DA SALIVA	12
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS	13
ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
3 RESULTADOS	14
4 DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
APÊNDICES	23
APÊNDICE A	24
APÊNDICE B	28
APÊNDICE C	30
ANEXO A	34
ANEXO B	36
ANEXO C	37
ANEXO D	38
ANEXO E	58
ANEXO F	59
ANEXO G	64

1 INTRODUÇÃO

A anemia de Fanconi (AF) foi descrita em 1927 por Guido Fanconi, relatando o caso de três irmãos com anemia aplástica e as características clínicas relevantes para o diagnóstico (JANSISYANONT *et al.*, 2000). A AF é uma desordem genética complexa com envolvimento de genes autossômicos recessivos (OLGIVIE *et al.*, 2002; GASPARINI *et al.*, 2006), com incidência de 1:360.000 (ALTER, 1997). Em 2007, Alter descreveu a presença de um gene recessivo modulador de AF localizado no cromossomo X.

Os defeitos genéticos da doença ocorrem no mecanismo de reparo do DNA, comprometendo a remoção dos radicais livres. Foram identificados treze grupos genéticos modulados por treze genes diferentes, onde cada um possui determinado *locus* gênico. Estes grupos são chamados de subtipos de AF: FANC A, B, C, D₁, D₂, E, F, G, I, J, L, M e N (ALTER, 2007). As células dos portadores de AF são hipersensíveis aos agentes clastogênicos de DNA diepoxietilbutano (DEB) e mentomicina (MMC), que são marcadores específicos para o diagnóstico preciso da doença. Quando as células dos pacientes portadores de AF são expostas a esses agentes, sofrem quebra cromossômicas irreversíveis (TISCHKOWITZ e HODGSON, 2003).

A AF é referida por Sagaseta de Ilurdoz *et al.*, 2003; GASPARINI *et al.*, 2006 como “síndrome” pelo envolvimento multissistêmico, podendo também ser nomeada como “Síndrome de Instabilidade Genética” (BERREBI *et al.*, 2006). Complicações nos sistemas gastrintestinal, geniturinário, músculo-esquelético, tegumentar, cardiovascular, auditivo e hematopoiético podem ser identificadas nos pacientes portadores desta enfermidade (KERVILER *et al.*, 2000; KUTLER *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2007). Alterações em membros superiores afetando a morfologia e função de osso rádio e polegares são comumente observados em pacientes portadores de AF (ALTER, 1997).

As complicações hematológicas ocorrem na primeira década de vida, entre 5 e 10 anos de idade. Apresentam trombocitopenia e neutropenia, além de infecções e sangramentos cutâneos (OTAN *et al.*, 2004). Esses pacientes apresentam maior risco de desenvolvimento de leucemia mielóide aguda ou síndrome mielodisplásica (OLIVEIRA e HAUFF, 1996; JANSISYANONT *et al.*, 2000; ÖKSÜZOĞLU e YALÇIN, 2002) e tumores sólidos, como carcinomas hepatocelulares

e espinocelulares (CEC). Os CEC acometem com mais frequência a boca, orofaringe e região anogenital (OTAN *et al.*, 2004; SALUM *et al.*, 2006).

O tratamento definitivo para a doença é o transplante de medula óssea (TMO) (OLIVEIRA e HAUFF, 1996; JANSISYANONT *et al.*, 2000).

As manifestações bucais em pacientes com AF ainda não são totalmente determinadas. Na literatura citam-se a microdontia generalizada com macroglossia (AÇIKGÖZ *et al.*, 2005), periodontite agressiva juvenil (YALMAN *et al.*, 2001; AÇIKGÖZ *et al.*, 2005; ARAÚJO, 2007), redução do fluxo salivar e da capacidade de tamponamento salivar (YALMAN *et al.*, 2001; MATTIOLI, 2005), agenesias dentais, e em alguns pacientes, a presença de elementos supranumerários (AÇIKGÖZ *et al.*, 2005). De acordo com Koubik *et al* (2006), pode ocorrer discrepância entre as idades dental, cronológica e óssea.

Os relatos de prevalência de lesões cárias nesses pacientes são ainda não conclusivos. Sugerem apenas que os indicadores da doença cárie são mais elevados que o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (YALMAN *et al.*, 2001; AÇIKGÖZ *et al.*, 2005) e que a microbiota bucal destes pacientes é semelhante à microbiota bucal de indivíduos que não apresentam complicações hematológicas (TEKCICEK *et al*, 2007) .

A cárie dental é uma doença infecciosa bacteriana, crônica, complexa, de natureza multifatorial, transmissível, tratável e que clinicamente manifesta-se com a destruição, em graus variáveis dos tecidos dentais mineralizados (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001). Para que ocorra a formação de cárie dental é necessária a presença inicialmente de um biofilme composto por bactérias potencialmente capazes de promover a doença cárie. A dieta rica em carboidratos fermentáveis potencializa a aderência destas bactérias, tornando o biofilme cariogênico. (CURY, 2000; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002).

Para crianças em idade precoce, a identificação de estreptococos do grupo mutans serve como um dos principais fatores preditores para determinação do risco ao desenvolvimento a doença cárie (GRINDEFFORD *et al*, 1996), independente de presença ou ausência de lesões cárias (O'SULLIVAN e THIBODEAU, 1996).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi correlacionar os fatores de risco à doença cárie em pacientes portadores de Anemia de Fanconi avaliando dieta, higienização bucal, a presença de ações de prevenção para a doença cárie, microbiota bucal potencialmente cariogênica,

especificamente estreptococos do grupo mutans e a experiência de doença por meio de levantamento de índice CPO-D/ ceo-d.

2 METODOLOGIA

Delineamento da Pesquisa

Foi realizado um estudo de casos com amostra intencional de pacientes portadores de AF. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – CEP PUCPR – sob o parecer número: 0011470/08, Protocolo CONEP número: 0040.0.084.000-08 e Protocolo CEP número: 2242 (ANEXO A) e autorizado pelo corpo clínico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) (ANEXO B)

A população que participou deste estudo constituiu-se de 35 pacientes com idades variando de 4 e 20 anos com média de 10,8 anos (± 3) e portadores de AF, sendo 22 do sexo masculino e 13 do sexo feminino. A amostra final deste estudo constituiu-se de 31 pacientes, pois foram incluídos na amostra os pacientes entre 4 e 20 anos de idade, portadores de AF com o diagnóstico confirmado pelo teste cromossômico DEB que encontravam-se em tratamento no Departamento de Hematologia Pediátrica do HC – UFPR e que os responsáveis legais consentiram em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam alterações neurológicas funcionais, pacientes que utilizavam colutórios bucais por um período superior a trinta dias, os transplantados de medula óssea e aqueles cujo às amostras de saliva não apresentaram crescimento microbiano nos meios seletivos para as espécies estudadas.

Exame Clínico

A avaliação clínica foi realizada por um único examinador, em consultório odontológico, com auxílio de instrumental odontológico apropriado e esterilizado, iluminação por meio de refletor. Foram anotados em ficha padrão dados pessoais, história médica e familiar. Foram questionados consumo de dieta rica em açúcares, hábitos de higiene como escovação dental e utilização de fio-dental, ações de prevenção a doença cáries: acesso a flúor e visitas ao dentista. No exame físico extrabucal foi avaliada a presença de alteração em membros superiores. No exame físico intrabucal foram avaliados e anotados os seguintes índices:

1. A presença de placa bacteriana visível nas superfícies vestibulares e/ou linguais de todos os dentes presentes segundo índice de higiene oral simplificado (IHO-S) (GREENE e VERMILLION, 1960);
2. Presença de cárie ou de cicatriz de cárie por meio da contagem de dentes cariados, perdidos por cárie ou restaurados, segundo índices CPO-D (para dentes permanentes) e ceo-d (para dentes decíduos), conforme preconizado pela OMS (1997).

Coleta da Saliva

As amostras de saliva foram coletadas antes do exame físico intrabucal em ambiente hospitalar. Os pacientes foram orientados a não deglutir a saliva e, quando solicitado, expelir a saliva em uma placa de Petri de vidro esterilizada.

De cada paciente foram coletados 500µL de saliva com o auxílio da micropipeta com a ponteira esterilizada que imediatamente foram inoculados em tubo identificado contendo água peptonada. No período de até duas horas, o material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (LABMICRO-UFPR) para que fosse processado e cultivado de acordo com os critérios seletivos do grupo de microrganismo de interesse.

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Isolamento, Identificação e Estimativa de Estreptococos do grupo mutans a partir de Amostras de Saliva

Para o isolamento de bactérias do grupo mutans, foi realizada diluição das amostras salivares em água peptonada na proporção de 10:1 (MOREIRA *et al*, 2007; NEIVA, 2007), homogeneizadas por 20 segundos e 0,1mL da solução diluída foi semeada em Ágar Mitis Salivarius Sacaroso adicionado de bacitracina (AMSB) (30µg/mL de meio) e telurito de potássio (PCO₂ 10%), e incubada a 37°C por 48horas.

Após incubação, foi realizada a contagem das colônias características de estreptococos do grupo mutans baseada em Unidades Formadoras de Colônias/mL de saliva cultivada (UFC/mL) multiplicando-se o número de colônias encontradas na placa pelo fator de diluição.

Em seguida foram selecionadas 10 colônias, utilizando como critério a macro morfologia característica de estreptococos do grupo mutans para a realização de provas bioquímicas, com a finalidade de concluir a identificação. Essas 10 colônias foram repicadas em infuso de cérebro e coração (BHI) e incubadas à temperatura de 37°C por 48horas. Deste repique uma alçada de cada colônia foi corada pelo método Gram para a análise da micromorfologia (KONEMAN, 2001).

Provas Bioquímicas para Identificação de Estreptococos do Grupo mutans

A caracterização bioquímica de Estreptococos do grupo mutans foi realizada de acordo com as provas recomendadas para este grupo. As colônias isoladas em placas de Petri contendo meio seletivo AMSB, que possuíam micromorfologia característica de estreptococos

apresentando Gram positividade e Catalase negativa, foram identificadas bioquimicamente pela fermentação dos açúcares manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e hidrólise de ágar bile esculina e caldo arginina, de acordo com Koneman (2001).

Análise Estatística

Todos os dados obtidos dos pacientes foram tabulados no programa *Excel for Windows 2003* e submetidos à análise descritiva e testes estatísticos. Inicialmente testou-se a normalidade da amostra com o teste de normalidade de Kolmogorov – Smirnov para variáveis quantitativas e contínuas, em escala de razão. Teste de Levene para a homogeneidade das variâncias. Apesar da amostra demonstrar distribuição normal para a variável idade, utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney entre dois grupos, para variáveis ordinais, onde em cada grupo a amostra foi menor que trinta indivíduos. O Teste Exato de Fischer foi utilizado para avaliar variáveis categóricas dicotômicas. Para variáveis nominais categóricas onde a tabela de contingência gerada era maior que 2x2, utilizou-se o Teste Qui-Quadrado para verificar a independência entre as variáveis. Para variáveis que apresentaram escala ordinal, utilizou-se o Teste de Coeficiente de Correlação de Spearman para avaliação do grau de associação entre duas variáveis e Teste de Diferença Entre Duas Proporções todos os testes demonstraram ser estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A amostra foi composta 31 indivíduos de ambos os sexos, representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Frequência dos indivíduos portadores de Anemia de Fanconi por faixa etária e sexo

FAIXA ETÁRIA	SEXO				TOTAL	
	MASCULINO		FEMININO		N	%
	N	%	N	%		
00 ----- 05	1	3,22	1	3,23	2	6,45
05 ----- 10	10	32,26	4	12,90	14	45,16
10 ----- 15	5	16,13	6	19,35	11	35,48
15 ----- 20	3	9,68	1	3,23	4	12,90
TOTAL	19	61,29	12	38,71	31	100

Fonte: Dados da pesquisa provenientes dos questionários individuais PUCPR - 2009

Aplicando-se os testes de Kolmogorov – Smirnov e Levene, a amostra demonstrou ser homogênea e com distribuição normal para a variável idade. A média das idades foi de 10,48 anos ($\pm 3,4$), variando entre 4 e 20 anos.

Valores médios para os indicadores bucais foram obtidos neste estudo, estando eles representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios para índice de higiene bucal, indicadores de experiência de cárie progressa e risco biológico à doença cárie distribuídos por faixa etária.

FAIXA ETÁRIA	TOTAL		INDICADORES BUCAIS (VALORES MÉDIOS)			UFC/mL GRUPO MUTANS ⁴
	N	%	IHO-S ¹	CPO-D ²	ceo-d ³	
00 ----- 05	2	6,45	0,60	-----	3,50	6,65x10 ³
05 ----- 10	14	45,16	1,00	0,57	4,00	4,07x10 ³
10 ----- 15	11	35,48	1,16	2,45	7,00	4,62x10 ³
15 ----- 20	4	12,90	0,44	2,00	1,00	4,47x10 ³
TOTAL	31	100				
MÉDIAS			0,88	1,68	3,88	4,95x10 ³

Fonte: Dados da pesquisa PUCPR – 2009

Legenda: ¹ Índice de higiene oral simplificado
² Índice para dentes permanentes cariados, perdidos e obturados
³ Índice para dentes decíduos cariados, perdidos e obturados
⁴ Risco microbiológico à doença cárie

As correlações estatisticamente significativas foram referentes ao risco à doença cárie com CPO-D $p= 0,002$ e $r=0,531$ onde quanto maior o risco a atividade de cárie, determinado pelas UFC do grupo mutans por mL de saliva, maior o índice CPO-D segundo aplicação do Teste de correlação de Spearman.

Sobre as observações realizadas frente aos questionários de saúde pôde-se determinar, aplicando-se o Teste estatístico Coeficiente de Correlação de Spearman diferença

estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$, entre as variáveis especificadas na tabela 3, sendo que todas as variáveis apresentaram significância estatística e correlação de nível regular ($0,3 < r < 0,6$).

Tabela 3 – Correlações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) para fatores de risco de desenvolvimento da doença cárie e ingestão diária de açúcar.

VARIÁVEL	VARIÁVEIS CORRELACIONADAS	VALOR p	VALOR r
INGESTÃO DIÁRIA DE AÇÚCAR	VISITAS AO SERVIÇO ODONTOLÓGICO	0,013	0,440
	UTILIZAÇÃO DE FLÚOR	0,016	0,429
	UTILIZAÇÃO DE FIO-DENTAL	0,002	0,545
	ESCOVAÇÃO DENTAL DIÁRIA	0,007	0,478

Fonte: Dados da pesquisa – PUCPR 2009

Dos 31 pacientes, foram isoladas 307 colônias de grupos de estreptococos, em uma amostra houve crescimento de apenas 7 colônias em 3 placas de meio AMSB e estas 307 colônias foram utilizadas para realização das provas bioquímicas que visaram identificação dos grupos de estreptococos. Na identificação bioquímica foram observadas outras espécies de estreptococos além de estreptococos do grupo mutans na proporção de 2:1, determinando que quando comparado com o montante total de isolados, os representantes dos outros grupos de estreptococos são mais prevalentes que os isolados do grupo mutans (figura 1).

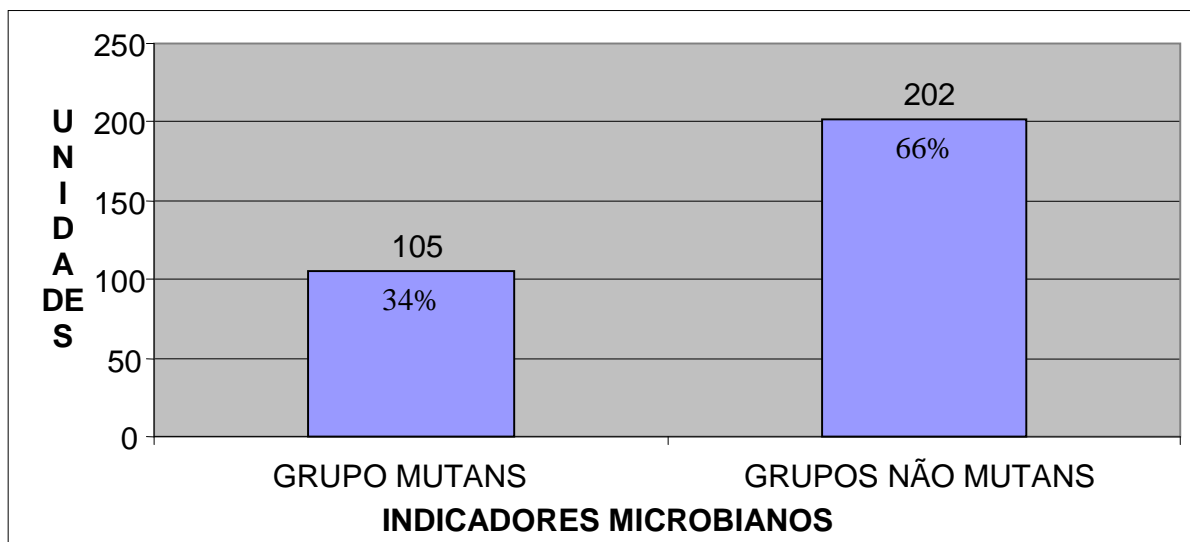


Figura 1 – Gráfico representando a proporção de colônias identificadas bioquimicamente representantes do Grupo mutans e dos outros Grupos de Estreptococos a partir de isolados de saliva de pacientes portadores de AF – Curitiba 2009.

Fonte: Dados da pesquisa PUCPR - 2009

A Figura 2 representa a porcentagem de colônias identificadas por métodos bioquímicos em cada grupo de isolados.

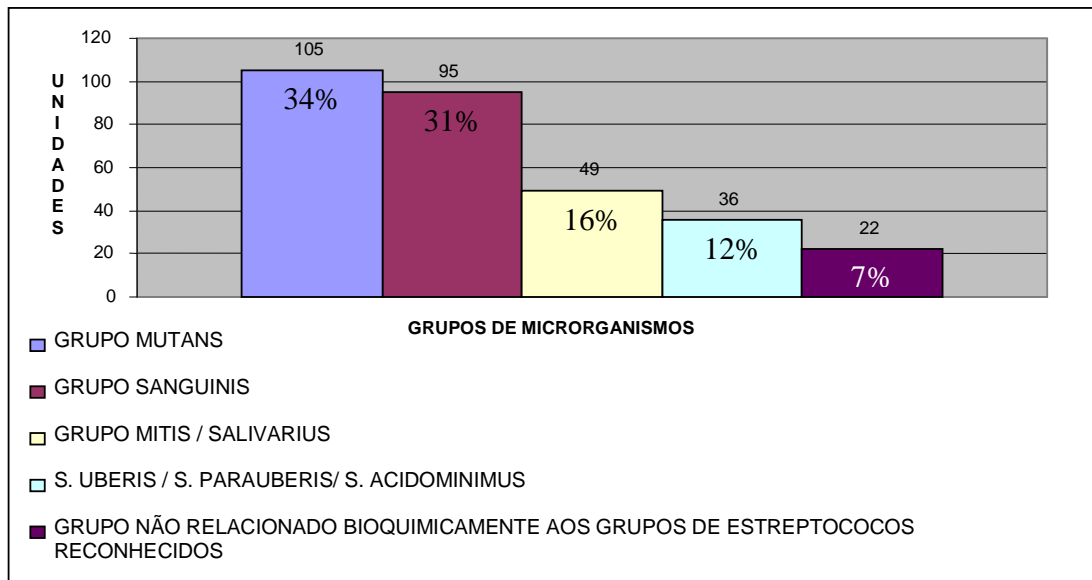


Figura 2 – Representação gráfica dos grupos de microrganismos e porcentagem de colônias identificadas por métodos bioquímicos a partir de isolados de saliva de pacientes portadores de AF – Curitiba 2009.

Fonte: Dados da pesquisa PUCPR - 2009

Destas 307 colônias de isolados identificados por provas bioquímicas houve correlações estatisticamente significantes ($p < 0,001$), ou seja, comparando os grupos de forma individual verifica-se que os isolados pertencentes ao grupo mutans são mais prevalentes que os pertencentes aos grupos mitis/salivários, grupo não relacionado bioquimicamente com estreptococos já reconhecidos e as espécies *S. uberis* / *S. parauberis* / *S. acidominimus* quando aplicado o Teste de Diferença Entre Duas Proporções. Determinando a prevalência dos isolados do grupo mutans quando comparados com os outros grupos de estreptococos isoladamente.

Entre os grupos mutans e sanguinis não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,42$), pois a proporção entre estes dois grupos foi equivalente, resultados representados na figura 2.

Algumas correlações não expressaram significância estatística. A independência entre IHO-S, escovação dental diária e membros superiores, demonstrando que o indivíduo que nasce com a deficiência física pode adaptar-se as suas limitações e conseguir realizar tarefas minuciosas como escovar os dentes e utilizar fio dental promovendo a remoção do biofilme bacteriano.

4 DISCUSSÃO

A amostra deste estudo foi homogênea e com distribuição normal para a variável sexo, confirmando estudos de Alter (2003) e Pasquini e Zanis Neto (2001) (distribuição entre homens e mulheres de AF de 1,2:1)

Os valores de referência para CPO-D, preconizados pela OMS para o ano de 2000, aos 12 anos de idade, é $\leq 3,00$. Os indivíduos examinados no presente estudo apresentaram CPO-D = 1,68 aos 10,5 anos ($\pm 3,71$), ou seja, um índice baixo, diferente dos achados de Yalman *et al.* (2001); Açıkgöz *et al.*, (2005) e Tekcicek *et al.* (2007), que encontraram CPO-D maior que o preconizado pela OMS. É possível que os valores aumentados de CPO-D encontrados nestes estudos pela presença na casuística de indivíduos portadores de alterações neurológicas funcionais, interferindo na qualidade da escovação e remoção do biofilme.

A amostra estudada foi composta por indivíduos com alto consumo de açúcares, moradores de diversas comunidades brasileiras e muitos deles sem acesso a água potável e fluoretada, a maioria tendo o primeiro contato com serviço odontológico durante a realização da pesquisa. Outros fatores relevantes para desenvolvimento de doença cárie são o baixo fluxo salivar e a baixa capacidade de tamponamento salivar na AF, já pesquisados por Yalman *et al.*, 2001; Mattioli, 2005; Tekcicek *et al.*, 2007. Mesmo com a presença destes fatores de risco ao desenvolvimento da doença cárie, no presente estudo observou-se baixos IHO-S e CPO-D.

Um método de avaliação do risco microbiológico à doença cárie é a contagem de colônias de estreptococos do grupo mutans, pela UFC/mL de saliva, com a graduação: alta contagem/ alto risco (superior a 10^6 UFC/mL), e baixa contagem/baixo risco (inferior a 10^5 UFC/mL). Neste estudo, a estimativa de UFC/mL foi de nível baixo, condizente com o CPO-D baixo, corroborando os estudos de Neiva (2007), que identificou correlação diretamente proporcional entre contagem de UFC/mL e CPO-D.

Dos isolados identificados bioquimicamente, 34% pertenciam ao Grupo *mutans*. Apenas 20% do montante geral confirmaram ser *S. mutans*, resultado diferente dos achados de Neiva (2007). Este autor estudou escolares não portadores de anemia de Fanconi com presença de fatores de risco locais e ambientais ao desenvolvimento da doença cárie semelhantes, utilizando igual metodologia de isolamento e identificação bioquímica dos microrganismos. Porém, seus

resultados foram significativamente mais altos (49% das colônias de *S. mutans* e mais de 60% de isolados de grupo mutans).

Os indivíduos portadores de AF estudados possuem os três principais fatores ao desenvolvimento da doença cárie propostos por Keys (1962): microrganismos potencialmente cariogênicos, consumo de açúcares (carboidratos fermentáveis) e superfícies dentais para sofrer desmineralização ácida, além dos fatores ambientais (SOETIARTO, 1999) e comportamentais (PERES et al., 2000).

5 CONCLUSÃO

Os pacientes portadores de AF da amostra estudada apresentaram fatores de risco ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença cárie. Entretanto, os índices CPO-D, IHO-S foram baixos, bem como baixa a contagem de UFC/mL de saliva. Parece lícito concluir que os pacientes portadores de anemia de Fanconi não apresentam susceptibilidade aumentada à doença cárie.

REFERÊNCIAS

- AÇIKGÖZ, Aydan; ÖZDEN, Feyza Otan; FISGIN, Tunç; AÇIKGÖZ, Gokhan; DURU, Feride; YARALI, Nesse; ALBAYRAK, Davut. Oral and dental findings in Fanconi's anemia. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 22, p. 531-539, 2005.
- ALTER, B. P. Arms and the man or hands and the child; congenital anomalies and hematologic syndromes. **J Pediatr Hematol Oncol**. v. 19, p. 287 – 291, 1997.
- ALTER, B. P. *et al.* Cancer in Fanconi anemia. **Blood**, New York, v. 101, n. 5, p. 2072-2073, 2003.
- ALTER, B. P. Diagnosis, genetics, and management of inherited bone marrow failure syndromes. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program**, p. 29 – 39, 2007.
- ARAÚJO, M. R.; RIBAS, M. O.; KOUBIK, A. C. G. A.; MATTIOLI, T. M. F.; LIMA, A. A. S.; FRANÇA, B. H. S. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. **Oral Dis**, v. 13, p. 291-295, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. COMITÊ BRASILEIRO DE FINANÇAS, BANCOS, SEGUROS, COMÉRCIO, ADMINISTRAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO. COMISSÃO DE ESTUDO DE DOCUMENTAÇÃO. **Informação e documentação: referências - elaboração**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002. 24 p.
- BERREBI, D.; LEBRAS, M.; BELARBI, N.; COUTURIER, J.; FATTET, S.; FAYE, A.; PEUCHMAUR, M.; LAGAUSIE, P. Bilateral adrenal neuroblastoma and nephroblastoma occurring synchronously in a child with Fanconi's anemia and VACTERL syndrome. **J Pediatr Surg**, v. 41, p. E11-E13, 2006.
- CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**. v. 34, n. 6, p. 491-7, 2000.
- GASPARINI, G.; LONGOBARDI, G.; BONIELLO, R.; PETRILLO; PELO, S. Fanconi anemia manifesting as a squamous cell carcinoma of hard palate: a case report. **Head Face Med**, v. 2, p. 1, 2006.
- GREENE, J. C.; VERMILLION, J. R. The oral hygiene index: a method of classifying oral hygiene status. **J Am Dent Assoc**, v. 61, p. 172 – 179, 1960.
- GRINDEFJOR, M.; DAHLLÖF, G.; NILSSON, B.; MODÉER, T. Stepwise prediction of dental caries in children up to 3,5 years of age. **Caries Res**, v.30, n.4, p.256-266, jul/aug, 1996.

JANSISYANONT, P.; PAZOKI, A.; ORD, R. A. Sacamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation en a patient with Fanconi's Anemia. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 58, p. 1454-1457, 2000.

KERVILER, E.; GUERMAZI, A.; ZAGDANSKI, A. M.; GLUCKMAN, E.; FRIJA, J. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. **Clin Radiol**, v. 55, p. 340-345, 2000.

KEYES, P.H. Recent advantages in dental research. **Int Dent J**. v.12, n. 4, p. 443 -64. 1962.

KONEMAN, Elmer W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. São Paulo: MEDSI, c2001. 1465 p.

KOUBIK, A. C. G. A.; FRANÇA, B. H. S.; RIBAS, M. O.; ARAÚJO, M. R.; MATTIOLI, T. M. F.; LIMA, A. A. S. Comparative study of chronological, boné and dental age in Fanconi's anemia. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 28, n. 4, p.260-262, 2006.

KUTLER, D. I.; AUERBACH, A. D.; SATAGOPAN, J.; GIAMPIETRO, P. F.; BATISH, S. D.; HUVOS, A. G.; GOBERDHAN, A.; SHAH, J. P.; SINGH, B. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi Anemia. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, January, v. 129, p. 106 – 112, 2003.

MATTIOLI, T. M. F. **Análise sialométrica e das concentrações salivares de cálcio, amilase, uréia e proteínas totais de indivíduos portadores da Anemia de Fanconi**. 96f. Dissertação (mestrado em odontologia, Estomatologia) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2005.

MOREIRA, M.; VICENTE, V. A.; GLIENKE, C. Genetic variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by rapd markers. **Braz J Microbiol**. v. 38, p.729-735, 2007.

NEIVA, I. F. **Caracterização molecular de biossorotipos selvagens de *Streptococcus mutans* isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie**. 120p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NOBRE DOS SANTOS, M.; MELO DOS SANTOS, L.; FRANCISCO, S. B., CURY, J. A. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. **Caries Res**. v. 36, n. 5, p. 347-52, 2002.

ÖKSÜZOĞLU, B. YALÇIN, Ş. Squamous cell carcinoma of the tongue in a patient with Fanconi's anemia: a case report and review of the literature. **Ann Hematl**, v. 81, p. 294-298, 2002.

OLGIVIE, P.; HOFMANN, U. B.; BRÖCKER, E. B.; HAMM, H. Hautmanifestationen der Fanconi-Anämie. **Haurtarzt**, v. 53, p. 253-257, 2002.

OLIVEIRA, I. C.; HAUFF, S. D. Anemia de Fanconi: a importância do diagnóstico precoce. **J Arq Cat Méd**, v. 25, n. 3, p. 242-6, jul/set, 1996.

O'SULLIVAN, D.M.; THIBODEAU, E.A. Caries experience and mutans streptococci as indicators of caries incidence. **Pediatr Dent**, v.18, n.5, p. 371-374, 1996.

OTAN, Feyza; AÇIKGÖZ, Gokhan; SAKALLIOĞLU, Umur; ÖZKAN, Burcu. Recurrent aphthous ulcers in Fanconi anaemia: a case report. **Int J Pediatr Dent**, v. 14, p. 214-217, 2004.

PASQUINI, R.; ZANIS NETO, J. Anemia de Fanconi. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e prática**. São Paulo: ed. Atheneu, p. 170 – 179, 2001.

PERES, K. G. A.; BASTOS, J. R. M.; LATORRE, M. R. Severidade de cárie em crianças e relação com aspectos sociais e comportamentais. **Rev Saúde Pública**. v. 34, n. 4, p. 402 – 408, 2000.

SAGASETA de ILURDOZ, M; MOLINA, J.; LEZÁUN, I.; VALLIENTE, A.; DURÁN, G. Anemia de Fanconi, consideraciones actuales. (Updating fanconi's anaemia). **An Sist Sanit Navar**, v. 26, p. 63 – 78, 2003.

SALUM, F. G.; MARTINS, G. B.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S.; TORRES-PEREIRA, C. Squamous cell carcinoma of the tongue after bone marrow transplantation in a patient with Fanconi's anemia. **Braz Dent J**, v. 17, n. 2, p. 161 – 165, 2006.

SOETIARTO, F. The relationship between habitual clove cigarette smoking and a specific pattern of dental decay in male bus drivers in Jakarta, Indonesia. **Caries Res**. v. 33, n. 3, p. 248-250, 1999.

TEKCICEK, M.; TAVIL, B.; PINAR, A.; UNAL, S.; GUMRUK, F. Oral and dental findings in children with Fanconi's anemia. **Pediatr dent**, v. 29, p. 248-252, 2007.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Santos, 2001. 421 p.

TISCHKOWITZ, M. D.; HODGSON, S. V. Fanconi anemia. **J Med Genet**. v. 40, p. 1 – 10, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Oral Health Survey. **Basic Methods**. Geneva, WHO; 1997

YALMAN, N.; SEPET, E.; AREN, G.; KÜLEKÇİ, G.; ANAK, S. The effect of bone marrow transplantation on systemic and oral health in Fanconi's aplastic anemia. **J Clin Pediatr Dent**, v. 25, p. 329 – 332, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: OCORRÊNCIA DE *S. mutans* E *Candida sp.* EM SALIVA DE PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA DE FANCONI

PROTOCOLO N°:

INVESTIGADOR: Dra. Marina de Oliveira Ribas

ENDEREÇO: Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Rua Imaculada Conceição nº 1155 – Prado Velho
80215-910 Curitiba- PR

TELEFONES DE CONTATO: (41) 3271-2549
(41) 9133-5136

INTRODUÇÃO

As informações que seguem neste consentimento servem a você e seus familiares para que seja entendido o propósito e a importância deste estudo para você mesmo e outras crianças portadoras de Anemia de Fanconi.

Sua participação é espontânea, ou seja, por sua vontade própria e/ou vontade própria de seus responsáveis.

Toda e qualquer dúvida ou pergunta deve ser feita para que possamos fazer os esclarecimentos necessários sobre a pesquisa e sobre sua participação nela. A qualquer momento você ou seus familiares poderão entrar em contato com os pesquisadores por meio de telefone ou dirigindo-se ao endereço acima para qualquer esclarecimento ou até mesmo para solicitar o seu desligamento na pesquisa. Os responsáveis por este estudo estarão sempre aptos a esclarecer dúvidas sobre a doença, portanto, é importante que você leia as informações a seguir com muita atenção para que tudo seja entendido.

FINALIDADE DO ESTUDO

O propósito desta pesquisa consiste em estudar os diferentes tipos de microrganismos existentes na saliva de pacientes portadores de Anemia de Fanconi e comparar com os problemas bucais que possam ocorrer decorrentes do tratamento e os inerentes a própria doença. Como você pode perceber e sentir, algumas manifestações vêm ocorrendo em sua boca desde o início da sua doença, algumas vezes mesmo antes de você saber que a possuía.

Estaremos avaliando todas as reações dos medicamentos utilizados e da própria doença que estão ocorrendo na sua boca. Isto poderá nos direcionar quanto às medidas que poderão ser tomadas para diminuir alguns sinais e sintomas desagradáveis que você vem sentindo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS

Esta pesquisa é do tipo exploratória que avaliará quantidade e qualidade das lesões que podem ocorrer em sua boca. Portanto serão examinadas 30 crianças portadoras de Anemia de Fanconi hospedadas na Associação Paranaense de Apoio a Criança com Neoplasia e que estão recebendo tratamento hematológico no Hospital de Clínicas.

No primeiro contato com a equipe responsável por este estudo, você será questionado sobre seus dados pessoais como idade, sexo e naturalidade. Ainda, sobre seu estado de saúde e de seus familiares para investigarmos sua história médica. Dados sobre sua doença como a fase na qual encontra-se, o tratamento ao qual você está sendo submetido e o uso de medicamentos, também será necessário ser obtido. A seguir será realizado um exame clínico (inspeção visual) intrabucal para verificarmos as lesões ou manifestações que podem estar ocorrendo – problemas bucais. Dados como o local, a forma, o tamanho e outros deverão ser anotados em uma ficha que se referirá apenas a você. Faremos a coleta de saliva com o auxílio de um instrumento apropriado, chamamos de micropipeta, onde as ponteiros utilizadas são esterelizadas e, após o uso, descartadas. Esta saliva colhida será enviada para um laboratório de microbiologia onde serão realizadas as culturas e identificação dos microrganismos existentes na saliva do paciente.

Você será examinado com o uso de luvas descartáveis e seguindo as normas de biossegurança vigentes e determinadas pela Vigilância Sanitária.

Poderá ser necessário realizar exames fotográficos sem que você seja prejudicado de forma alguma.

DESCRIÇÃO DE RISCOS

Este estudo não oferece risco algum a você nem a seus familiares, visto que não haverá nenhuma intervenção clínica ou cirúrgica odontológica sem a devida autorização do Serviço de Hematologia.

BENEFÍCIOS POSSÍVEIS AOS PARTICIPANTES

Sua participação neste estudo fornecerá informações importantes sobre as manifestações da Anemia de Fanconi na boca, portanto conheceremos melhor esta doença. E com isto poderão ser aplicados ou melhorados os tratamentos para as lesões bucais pertinentes ao tratamento e as lesões bucais pertinentes à própria doença.

CUSTOS

Você ou seus familiares estão isentos de qualquer custo dos exames clínicos, laboratoriais, fotografias, ou de outros procedimentos que possam ser realizados durante a pesquisa. E de modo algum não serão prejudicados financeiramente.

PARTICIPAÇÃO

Qualquer dúvida ou esclarecimento você poderá tirar mesmo durante a pesquisa com a Dra. Marina de Oliveira Ribas, pelo telefone: **(41) 3271-2549** ou com a aluna de Mestrado: Lisiane Cândido pelo telefone: **(41) 9133-5136**, ou ainda com qualquer uma das pesquisadora dirigindo-se ao endereço: **Rua Imaculada Conceição nº 1155 – Prado Velho – Clínica Odontológica.**

Sua participação é voluntária e você poderá se recusar a participar em qualquer momento se assim quiser. Nenhum prejuízo ocorrerá a você ou a seus familiares.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu _____, (pai / mãe / tutor) de _____, li atentamente e entendi todas as informações contidas neste esclarecimento sobre a participação de meu filho (a) neste estudo. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas assim como, a importância da participação do meu filho neste estudo. Recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento informado.

Concordo com a participação de meu filho neste estudo sem que nenhum prejuízo seja causado a ele ou aos familiares. Tenho total conhecimento também que nenhum ônus nos será cobrado.

Neste consentimento dou pleno direito para uso a favor do ensino e da divulgação em periódicos científicos sem a divulgação da identidade do meu filho (a), respeitando o código de ética.

Assinatura do Pai ou Mãe / Tutor legal

Data / Hora da assinatura

Nome em letra de forma do Pai ou Mãe / Tutor legal

Parentesco

Nome em letra de forma do Paciente

Assinatura da Pessoa que Administra este Consentimento

Data da assinatura

Nome em letra de forma da Pessoa que Administra este Consentimento

APÊNDICE B – Questionário de Saúde Respondido Pelo Responsável

Data:		
Nome do responsável:		
Estado civil:		
Endereço:		Bairro:
Telefone(s) para contato:	Cidade:	UF:
Profissão:		
Nome do paciente:		

Número de pessoas que moram na sua casa (inclusive você): _____

Posse de itens (quantos)

ITEM	QUANTIDADE
Televisão em cores	
Rádio (vale também <i>microsystem</i> ou rádio tipo <i>walkman</i>)	
Banheiro	
Automóvel	
Empregada mensalista (que trabalha pelo menos 5 dias por semana)	
Aspirador de pó	
Máquina de lavar roupa	
Videocassete e/ou DVD	
Geladeira duplex (com duas portas)	
Geladeira simples (não duplex)	
Freezer	
Computador	
Forno Elétrico	
Forno de Microondas	

Assinale com um "X" o maior grau de instrução da mãe e do pai do paciente

	MÃE	PAI
Analfabeto		
Primário incompleto		
Primário completo		
Ginásial incompleto		
Ginásial completo		
Colegial incompleto		
Colegial completo		
Superior incompleto		
Superior completo		

Primário – 1ª a 4ª série do 1º grau (ensino fundamental) Ginásial – 5ª a 8ª série do 1º grau (ensino fundamental) Colegial – 1ª, 2ª e 3ª séries do 2º grau (ensino médio) Superior – faculdade

ALIMENTAÇÃO DA CRIANÇA: (ESPECIFICAR OS ALIMENTOS)

CAFÉ DA MANHÃ _____

- LANCHE D MANHÃ _____
- ALMOÇO _____
- LANCHE DA TARDE _____
- JANTA _____
- LANCHE DA NOITE _____

HIGIENIZAÇÃO BUCAL:

- ESCOVA DE DENTES: INDIVIDUAL COLETIVA
- ESCOVAÇÃO DENTAL: 1X/DIA 2X/DIA 3X/DIA APÓS REFEIÇÕES
- FIO DENTAL: DIARIAMENTE ESPORADICAMENTE PALITO

Peruntas sobre a saúde bucal do seu filho (a)

1) Quantas vezes seu filho (a) ingere açúcar (salgadinhos, bolachas, lanchinhos), por dia, fora das refeições?

nenhuma vez () até 3 vezes () mais de 3 vezes ()

2) Quantas vezes ao ano seu filho (a) vai ao dentista?

nenhuma vez () 1 vez () 2 vezes ou mais ()

dentista particular () dentista do Posto de Saúde ()

3) Seu filho (a) usa flúor?

sim () não ()

3.1) Caso sua resposta anterior tenha sido **sim**, relate quando seu filho (a) utiliza flúor:

todos os dias () de vez em quando () só no dentista ()

3.2) Qual forma seu filho (a) utiliza o flúor:

bochecho () gel () verniz ()

4) Alguém na família com alguma destas doenças?

()câncer, ()diabetes, ()doenças do coração, ()rins,
 ()fígado, ()gastro-intestinal, ()hemorrágica, ()vias aéreas
 ()infecto-contagiosas, ()alergia, ()pressão arterial

5) Casamento co-sangüíneo?

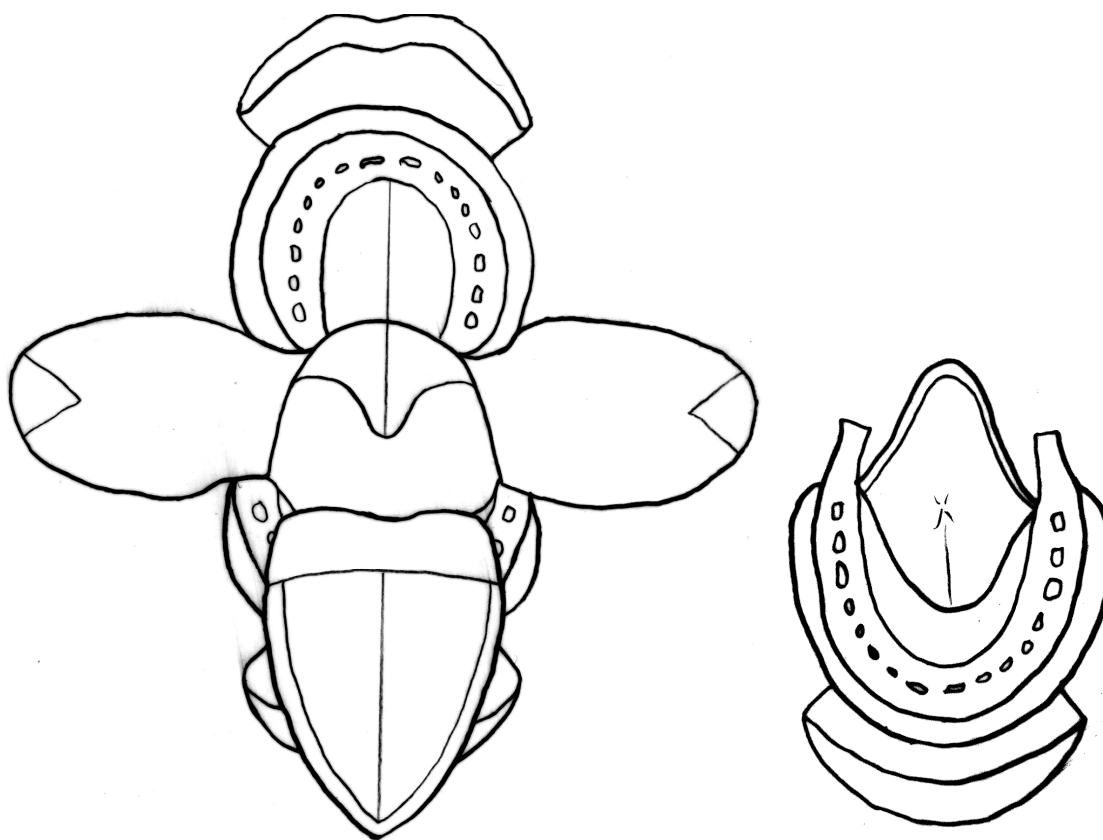
sim () Grau de parentesco _____

não ()

APÊNDICE C - Ficha clínica individual – Indicadores biológicos relacionados à cárie

Data:	Data Diagnóstico AF:		
Nome:			
Cidade de nascimento:	Sexo:	Grupo Étnico (B, N, M, A, I):	
Data de nascimento:	Idade em anos:		
Nome do responsável:			

MANIFESTAÇÕES ESTOMATOLÓGICAS EM TECIDOS MOLES BUCAIS



FLUROSE

() SIM – grau e região: _____ () NÃO

PERIODONTITE

() SIM – grau e região: _____ () NÃO

CÁLCULO DENTAL

() SIM – grau e região: _____ () NÃO

CPO-D / ceo-d

18	17	16	15	14	13	12	11
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

21	22	23	24	25	26	27	28
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

55	54	53	52	51
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

61	62	63	64	65
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

IP

IG

85	84	83	82	81
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

71	72	73	74	75
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

48	47	46	45	44	43	42	41
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

31	32	33	34	35	36	37	38
P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___	P ___
G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___	G ___

- Códigos Diagnóstico CPO-D:**

 - 0 – Hígido
 - 1- Cárie
 - 2- Restaurado sem cárie
 - 3- Restaurado com cárie
 - 4- Perdido por cárie
 - 5- Perdido por outras razões
 - 6- Selado
 - 7- Suporte para prótese, coroa protética ou faceta / implante
 - 8- Dente não irrompido
 - 9- Sem registro
 - 10- Mancha branca *ativa*
 - 11- Mancha branca *paralisada*
 - 12- Erosão
 - 13- Estado de raiz
 - T – Trauma (fratura)

ANEXOS

ANEXO A



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0001470/08**

Protocolo CEP Nº **2242**

Título do projeto **Ocorrência de Streptococcus mutans e Candida spp. Em saliva de pacientes portadores de anemia de Fanconi**

Grupo **III**
Versão **2**

Protocolo CONEP **0040.0.084.000-08**

Pesquisador responsável **MARINA DE OLIVEIRA RIBAS**

Instituição

Objetivos

Determinar os diferentes tipos de microrganismos existentes na microbiota bucal dos pacientes portadores de anemia de Fanconi através de culturas de inócuos de saliva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Levantar o índice CPO-D e/ou ceo-s das crianças portadoras de anemia de Fanconi; Identificar a microbiota bucal das crianças portadoras de anemia de Fanconi; Mensurar a quantidade de estreptococos do grupo mutans; Mensurar a quantidade de Candida spp.; Determinar o risco de doença cárie nas crianças portadoras de anemia de Fanconi.

Comentários

Estudo bem delineado, trata-se de estudo exploratório com amostra intencional de pacientes pediátricos portadores de anemia de Fanconi em tratamento no HC-UFPR.

Termo de consentimento livre e esclarecido

De acordo com as orientações do CONEP.

Conclusões

Todas as pedências listadas no parecer anterior foram sanadas e/ou esclarecidas.

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **30/04/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.



Parecer Nº **0001470/08**Protocolo CEP Nº **2242**Titulo do projeto **Ocorrência de Streptococcus mutans e Candida spp. Em saliva de pacientes portadores de anemia de Fanconi**Grupo **III**
Versão **2**Protocolo CONEP **0040.0.084.000-08**Pesquisador responsável **MARINA DE OLIVEIRA RIBAS**

Instituição

Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 30 de Abril de 2008.



Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUCPR



ANEXO B

Autorização do Corpo Clínico HC-UFPR para o desenvolvimento da pesquisa nas dependências do hospital.



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DECLARAÇÃO

Declaro que conheço e concordo com o desenvolvimento da pesquisa intitulada “**Ocorrência de Streptococcus mutans e Candida spp. em saliva de pacientes portadores de anemia de Fanconi**” no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, o qual será desenvolvido pela Profa. Dra. Marina de Oliveira Ribas.

Ressalta-se a obrigatoriedade por parte da Pesquisadora em apresentar a esta Instituição no decorrer da pesquisa, relatório anual, bem como ao seu encerramento comunicar-nos oficialmente de posse da publicação, na qual deverá constar o crédito a essa universidade.

Curitiba, 25 de setembro de 2008.

Profa. Dra. Heda Maria B. dos S. Amarante
Diretora de Corpo Clínico
do Hospital de Clínicas da UFPR

Ciente do Pesquisador:

Carimbo e assinatura

ANEXO C

Tabela 4- Identificação Bioquímica dos Microrganismos

	MANITOL	SOBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA
GRUPO MUTANS						
<i>S. mutans</i>	+	+	-	+	+ ⁻	+ ⁻
<i>S. ferus</i>	+	+	-	-	-	+
<i>S. cricetus</i>	+	+	-	+	+	V
<i>S. downei</i>	+	+	-	-	-	-
<i>S. macacae</i>	+	+	-	+	-	+
<i>S. rattus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. sobrinus</i>	+	- ⁺	-	- ⁺	-	-
GRUPO MITIS						
<i>S. acidominimus</i>	V	-	- ⁺	-	NA	-
<i>S. uberis/parauberis</i>	+	+	+	V	-	+
GRUPO MITIS						
<i>S. mitis</i>	-	- ⁺	-	+	+	-
<i>S. oralis</i>	-	-	-	V	V	- ⁺
GRUPO SALIVARIUS						
<i>S. salivarius</i>	-	-	-	- ⁺	- ⁺	+
<i>S. vestibularis</i>	-	-	-	-	-	+ ⁻
GRUPO SANGUINIS						
<i>S. gordonii</i>	-	-	+	- ⁺	- ⁺	+
<i>S. crista</i>	-	-	+ ⁻	-	-	-
<i>S. parasanguinis</i>	-	- ⁺	+	+ ⁻	+ ⁻	- ⁺
<i>S. sanguinis bio1</i>	-	V	+	+	+	+
<i>S. sanguinis bio2</i>	-	+ ⁻	+	+	V	+
<i>S. sanguinis bio3</i>	-	-	+	-	-	- ⁺

Fonte: Koneman *et al*, 2001 p.624-628

LEGENDA:

+ → positivo

- → negativo

+⁻ → maioria das cepas positivas, mas algumas podem ser negativas

-⁺ → maioria das cepas negativas, mas algumas podem ser positivas

V → variável

NA → não avaliado

ANEXO D - METODOLOGIA ESTENDIDA

1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Foi realizado um estudo exploratório com amostra intencional de pacientes pediátricos portadores de anemia de Fanconi. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – CEP PUCPR – sob o parecer número: 0011470/08, Protocolo CONEP número: 0040.0.084.000-08 e Protocolo CEP número: 2242 (ANEXO A). Este estudo foi autorizado pelo Corpo Clínico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para que pudesse ser realizado nas dependências do Hospital (ANEXO B)

1.1 Linha de Pesquisa

A linha de pesquisa é Epidemiologia, Diagnóstico e Terapêutica, devidamente cadastrada nas instituições competentes.

2 POPULAÇÃO

A população que participou deste estudo constituiu-se de pacientes pediátricos portadores de anemia de Fanconi, de ambos os sexos.

3 AMOSTRA

A amostra do grupo experimental foi do tipo intencional aleatória de pacientes portadores de anemia de Fanconi e tratados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC - UFPR), no ambulatório de Hematologia Pediátrica.

3.1 Casuística

Fizeram parte do estudo aproximadamente 35 indivíduos com faixa etária entre 4 e 20 anos. Foi realizado um estudo de casos, onde o grupo amostral do estudo foi formado por 31 crianças portadoras anemia de Fanconi.

4 MÉTODOS

4.1 Critérios de Inclusão:

- a) ser portador de Anemia de Fanconi, com diagnóstico confirmado pelos exames cromossômicos;
- b) possuir idade entre 4 e 20 anos;
- c) ser freqüentador da Associação Paranaense de Apoio a Criança com Neoplasia e/ou tratado para Anemia de Fanconi no departamento de hematologia pediátrica do Hospital de Clínicas – UFPR;
- d) consentir em participar da pesquisa por meio de assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

4.2 Critérios de Exclusão

- a) possuir alterações neurológicas funcionais;
- b) utilização de antissépticos bucais por um período superior a trinta dias;
- c) ter realizado transplante de medula óssea;
- d) ausência de crescimento de microrganismos em meio Ágar Mitis Salivarius Sacarosado com Bacitracina.

4.3 Anamnese

Foram anotados dados importantes referentes à história média atual e pregressa do paciente, história médica familiar, grupo étnico, procedência, presença de casamento co-sanguíneo na família, dados do prontuário médico como medicamentos e tratamentos progressos, demais anomalias físicas e dados hematológicos importantes como: contagem de hemácias, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos, plaquetas, forma da hemácia, fosfatase alcalina, bilirrubinas, glicose, creatinina, transaminase oxalacética e transaminase pirúvica. Quanto aos marcadores hematológicos, foi realizada a média aritmética de três exames anteriores à consulta odontológica (ANEXO E).

Os hábitos de higiene e dietéticos foram questionados, onde foi verificado padrão extremo e intermediário de consumo de dieta rica em sacarose, e de escovação dental, além de questionamentos sobre as condições sócio-econômicas e culturais da família. Estes questionamentos auxiliaram para avaliar o risco a cárie, foram realizados no momento do exame clínico e compunham o item “Questionário de Saúde – Respondido pelo Responsável” (APÊNDICE B).

4.4 Exame Clínico

A avaliação clínica foi realizada por um único examinador, em consultório odontológico, com auxílio de instrumentais odontológicos apropriados, esterelizados conforme as normas de biosssegurança e iluminação por meio de refletor, onde foi verificada, com o auxílio de uma sonda com ponta romba, a presença de placa bacteriana visível nas superfícies vestibulares e/ou linguais de todos os dentes presentes segundo índice Índice de Higiene Oral Simplificado (IHO-S) proposto por Greene e Vermillion (1960), tendo como objetivo quantificar o biofilme dental. O IHO-S foi avaliado em todos os dentes em ambos arcos e em 6 pontos de cada dente, sequencialmente: méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e méso-lingual, segundo o grau abaixo descrito:

Grau 0: ausência de placa;

Grau 1: placa após passar a sonda pela margem gengival;

Grau 2: placa visível na coroa dental;

Grau 3: abundante quantidade de placa visível na coroa dental;

X : dente índice e substituto inexistentes.

Os seis valores referentes aos seis pontos mensurados em cada dente foram somados e divididos por seis, obtendo-se um valor de IHO-S para cada dente. Somando-se todos os valores de IHO-S dos dentes e dividindo-se pelo número de dentes examinados, será fornecido o valor da média do índice de placa para cada indivíduo.

Índice Gengival (IG): O índice gengival de LÖE (1967) foi registrado com objetivo de determinar o grau de inflamação gengival. O IG foi medido em todos os dentes dos dois arcos dentários e em 6 pontos, na sequência: méso-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e méso-lingual, segundo o grau abaixo descrito:

Grau 0: ausência de inflamação (saúde)

Grau 1: inflamação leve

Grau 2: inflamação moderada

Grau 3: inflamação severa (sangramento espontâneo)

Os seis valores referentes aos seis pontos mensurados em cada dente foram somados e divididos por seis, obtendo-se um valor de IG para cada dente. Somando-se todos os

valores de IG dos dentes e dividindo-se pelo número de dentes examinados, foi fornecido o valor da média do índice gengival para cada indivíduo.

Foi avaliada a presença/ausência de cálculo na superfície lingual de incisivos inferiores; presença de cárie ativa; contagem de dentes cariados, perdidos por cárie ou restaurados, segundo índices CPO-D (para dentes permanentes) e ceo-d (para dentes decíduos), conforme preconizado pela OMS (1997); foi ainda realizado exame estomatológico minucioso em tecidos peribucais e mucosas, conforme preconizado por SILVA, 1997 e todos os dados obtidos foram registrados individualmente nas fichas clínicas de cada paciente, intituladas “ficha clínica individual – indicadores biológicos relacionados à cárie” (APÊNDICE C).

Na avaliação bucal, foram utilizados os parâmetros de normalidade sugeridos por CASTRO *et al*, 2000 como padrões de referência. As manifestações bucais encontradas foram descritas nas fichas clínicas individuais e registradas em desenhos esquemáticos quanto ao tamanho, textura, coloração, lesão fundamental e localização.

4.5 Riscos e Benefícios

Para as crianças que participaram da pesquisa não houve riscos, pois os exames realizados foram apenas visuais, com o auxílio de espelho odontológico e espátulas de madeira. A utilização de sonda com ponta romba foi apenas para remover a placa dental visível de cada dente, com o objetivo de se obter o IHO-S. A saliva foi coletada com o auxílio de uma micropipeta com ponteira de uso único esterilizada pelo fabricante, onde a criança foi instruída a cuspir em uma placa de Petri esterilizada ou apenas abrir a boca onde foram coletados 0,5mL de saliva. Todos os procedimentos foram realizados conforme as normas de Biossegurança estipuladas pela Vigilância Sanitária.

Quanto aos benefícios, foram principalmente sociais e científicos, pois a participação dos portadores de Anemia de Fanconi neste estudo forneceu informações importantes sobre as manifestações bucais da doença, favorecendo assim a divulgação no meio científico sobre tais achados, bem como a possibilidade de melhoria e aplicação dos

tratamentos tanto preventivos quanto curativos, mais adequados para as lesões bucais pertinentes à própria doença e as pertinentes ao tratamento de suporte da doença.

4. 6 Custos

Os pacientes participantes bem como seus familiares estiveram isentos de qualquer custo dos exames, fotografias ou de outros procedimentos que foram realizados durante a pesquisa. E de modo algum não foram prejudicados financeiramente.

5 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, com pressão atmosférica de 1 atm por 20 min. Vidrarias foram lavadas, secas em estufa apropriada para secagem de materiais e autoclavadas por 40 min., frascos, ponteiras e tubos tipo Eppendorf foram autoclavados à pressão de 1 atmosfera, por 20 min. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte em autoclave específica para material biológico contaminado, à pressão de 1 atmosfera, por 40 min.

6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

6.1 Meios De Cultura Utilizados

6.1.1 Água Peptonada

Triptona	2,5g
Peptona	2,5g
NaCl	5,0g
Água destilada	1000mL

6.1.2 Caldo Saboraud Dextrose

Peptona	10g
Dextrose	40g
Água Destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6.

6.1.3 Agar Mitis Salivarius Sacarado com Bacitracina e Telurito de Potássio (AMSB)

Agar Mitis Salivarius	45g
Sacarose	15g
Água Destilada	500mL
Bacitracina (sol. Estoque 50.000 µg/mL)	0,30 mL
Telurito do Potássio (1%)	0,50 mL

O pH foi ajustado para 7,3 -7,4. Após a autoclavagem o meio foi resfriado até 50°C, acrescentou-se bacitracina e o telurito de potássio, distribuiu-se em placas de Petri e armazenou-se sob refrigeração (GOLD *et al.*, 1973).

6.1.4 Agar Saboraud Dextrose

Peptona	10g
---------	-----

Dextrose	40g
Agar simples	15g
Água Destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6.

6.1.5 Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração)

BHI pó	37 g
Água Destilada	1000mL

6.1.6 Glicerol 40%

Glicerina	40 mL
Água Destilada	60 MI

6.1.7 Agar Sangue

Cloreto de sódio	04g
Extrato de carne	04g
Peptona	10g
Agar simples	1,5%
Água destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH1N

Em seguida, após o resfriamento do meio a 50⁰C, acrescentou-se sangue desfibrinado de carneiro para uma concentração final de 10%.

6.1.8 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TEB 1X	100mL

6.1.9 Tampão da amostra

Sacarose	40,0g
Azul de bromofenol	0,25g
Água destilada	100mL

Os ingredientes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

6.1.10 EDTA 0,5M

EDTA	37,22g
Água ultrapura	100mL
pH 8,0	

O EDTA foi pesado e acrescentou-se uma parte de água ultrapura autoclavada (aproximadamente 80% - 800mL) e o pH corrigido inicialmente com NaOH em pellet (aproximadamente 20g) e o ajuste final com NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, diluiu-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

6.1.11 Tampão CTAB

Tris-base	2,42g
Cloreto de sódio	8,2g
Na-EDTA	0,74g
CTAB	2g
Água ultrapura	80mL

pH:7,5

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100mL com água Ultrapura autoclavada.

6.1.12 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X)

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20mL
Água ultrapura	500mL
pH	8,0

6.1.13 Tampão tris-EDTA (TE)

Tris .HCl (pH: 8,0)	20mM
EDTA	20mM

6.1.14 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos em 3 µL de água destilada.

6.2 Coleta da Saliva

As amostras de saliva foram coletadas antes do exame clínico intrabucal, onde os pacientes foram orientados a não deglutir e, quando solicitado, expelir a saliva em uma

placa de Petri de vidro esterilizada ou apenas abrir a boca para que a saliva fosse removida pelo examinador com a utilização de micropipeta com ponteira esterilizada.

Em cada momento foram coletados 500µL de saliva que imediatamente foram inoculados em 2 tubos de ensaio identificados contendo, em um deles, Água Peptonada e no outro, Caldo Saboraud Dextrose, com o auxílio da micropipeta com a ponteira esterilizada. Num período de até duas horas, o material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia – Labmicro – da UFPR para que fosse processado e cultivado de acordo com os critérios seletivos do grupo de microrganismo de interesse.

7 PROCESSAMENTO LABORATORIAL DAS AMOSTRAS

7.1 Isolamento, Identificação e Estimativa de Estreptococos do Grupo mutans a partir de Amostras de Saliva

Para o isolamento de estreptococos do grupo mutans, foi realizada diluição (10⁻¹) das amostras salivares em água peptonada, homogeneizadas em agitador magnético Vortex® e 0,1mL da solução diluída foi semeada em meio Agar Mitis Salivarius Sacarado adicionado de bacitracina (AMSB) (30µg/mL de meio) e telurito de potássio (PCO₂ 10%), e incubada a 37°C por 48horas, em estufa de CO₂ em atmosfera de microaerofilia.

Após incubação, foi realizada a estimativa das colônias características de estreptococos do grupo mutans baseada em Unidades Formadoras de Colônias/mL de saliva cultivada (UFC/mL), multiplicando-se o número de colônias encontradas na placa pelo fator de diluição.

Em seguida foram selecionadas 10 colônias, utilizando como critério, a morfologia característica de *S. mutans* (Fig. 3) para a realização de provas bioquímicas, com a finalidade de concluir a identificação. Estas 10 colônias foram repicadas em infuso de cérebro e coração (BHI) e incubadas em microaerofilia em estufa de CO₂ regulada a

temperatura de 37°C por 48 horas, deste repique uma alçada de cada colônia foi corada pelo método Gram para a análise de micromorfologia (KONEMAN, 2001).

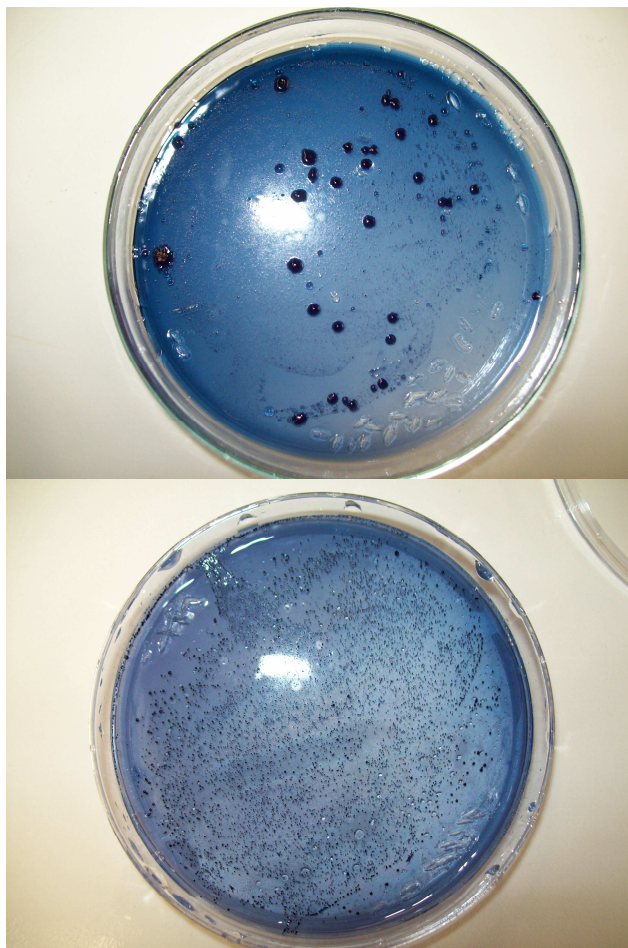


Figura 3 – Diferentes padrões de crescimento de colônias de Streptococcus em placas contendo meio AMSB – superior – colônias médias e grandes, inferior – colônias pequenas e puntiformes.

Fonte: Foto do autor

7.2.1 Provas Bioquímicas para Identificação de *S. mutans*

A caracterização bioquímica de estreptococos do grupo mutans seguiu os resultados das provas recomendadas para esta espécie onde os resultados foram comparados com os dados apresentados na Tabela 4 (ANEXO C). As colônias isoladas em placas de Petri contendo meio seletivo AMSB, que possuíam micromorfologia característica de estreptococos, apresentando Gram positividade (Fig. 4) e Catalase negativa, foram

identificadas bioquimicamente pela fermentação dos açúcares manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e hirólise em ágar bile esculina e caldo arginina, de acordo com Koneman (2001) seguindo as indicações na Tabela 4 (ANEXO C), os resultados das provas bioquímicas aplicadas encontram-se na Tabela 7 (ANEXO G).

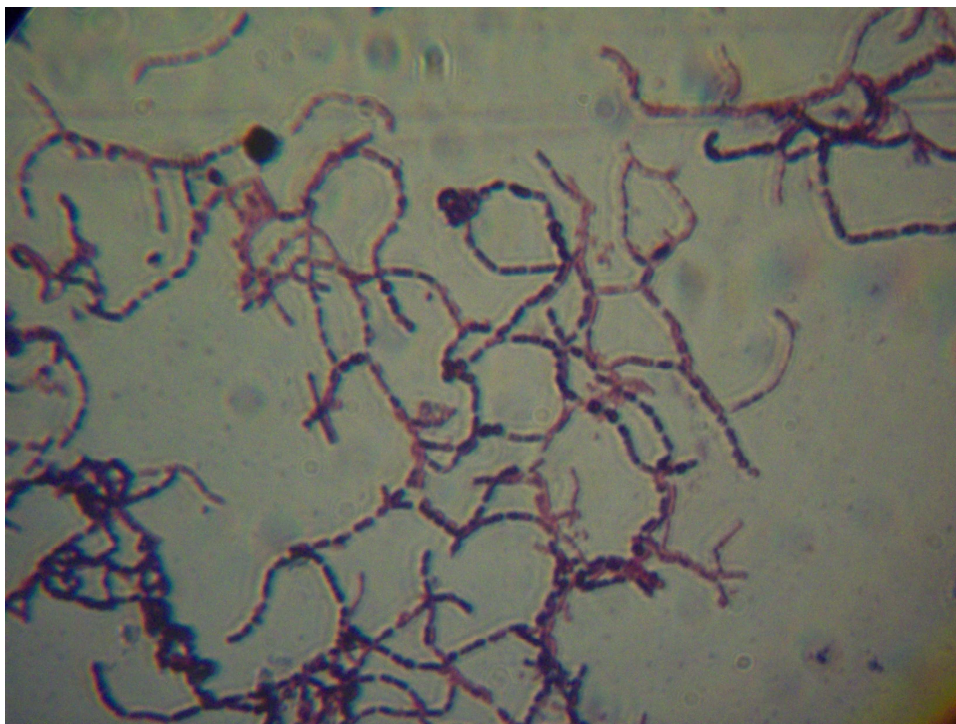


Figura 4: Fotomicrografia de colônias de Streptococos Gram + com aumento de 1000x em óleo de imersão.
Fonte: Foto do autor

7.2.1.1 Prova da Catalase

As colônias de bactérias do grupo mutans, isoladas e purificadas em AMSB, com micromorfologia correspondente ao gênero estreptococos foram submetidos à prova da catalase. A prova foi realizada sobre uma lâmina de vidro, colocando uma gota de água oxigenada 3% sobre três gotas de meio BHI após 48h de crescimento, observando a formação de bolhas de gás (prova positiva) ou ausência de bolhas de gás (prova negativa), onde foram selecionadas somente as colônias catalase negativa.

7.2.1.2 Prova da Fermentação do Sorbitol, Manitol, Rafinose e Melibiose

Um volume de 0,01mL de cultura das colônias confirmadas catalase negativa que foram cultivadas em meio base caldo BHI, foram pipetadas para tubos contendo 6mL de caldo púrpura de bromocresol (Newprov) adicionados de 1,7mL de açúcares (manitol 3,4%, sorbitol 3,4%, rafinose 3,4% e melibiose 3,4%), conforme o preconizado pelo fabricante. Estes tubos contendo indicador de pH (púrpura de bromocresol), açúcar e colônias foram incubados a 37°C por 48 horas em estufa de CO₂ em microaerofilia. A prova foi considerada positiva quando ocorreu a mudança da cor do indicador de pH, de roxo para amarelo.

7.2.1.3 Prova da Hidrólise da Esculina

Foi semeado uma alçada de cultura pura em Agar Bile Esculina Inclinado (Newprov). Após incubação a 37°C por 48 horas. O desenvolvimento de coloração negra determinou a positividade da prova.

7.2.1.4 Prova da Hidrólise da Arginina

Foi adicionado 0,01mL de cultura pura do microrganismo em meio caldo arginina (Newprov) contendo indicador de pH (púrpura de bromocresol). O tubo inoculado incubado a 37°C por 48 horas em estufa de CO₂ em ambiente de microaerofilia. Inicialmente, o meio mudava para amarelo devido à acidificação do indicador de pH pela fermentação da glicose presente no meio. Se a arginina era descarboxilada, pela presença da enzima dihidrolase, um produto final alcalino revertia o indicador para coloração púrpura, indicando a reação positiva. Os resultados das provas bioquímicas foram confrontados com os dados da Tabela 1 (ANEXO C).

7.3 Estoque

Após isolamento e caracterização bioquímica, os microrganismos, isolados de amostras salivares dos indivíduos portadores de anemia de Fanconi foram inoculados em caldo BHI e incubados por 24 horas, a 36°C. Após foi adicionado glicerol a 40% (para cada 1 mL de material, acrescentando-se 1mL de glicerol a 40%, resultando em uma concentração final de 20% de glicerol), as amostras foram congeladas a -80°C.

7.4 Análise Estatística

Todos os dados obtidos, tanto dos prontuários médicos e odontológicos dos pacientes quanto dos questionários respondidos pelos pais ou responsáveis, foram digitados e tabulados no programa *Excel for Windows 2003* e submetidos à análise descritiva e aos seguintes testes estatísticos:

- a) Teste de normalidade de Kolmogorov –Smirnov
- b) Teste de Levene para Homogeneidade das variâncias
- c) Teste U de Mann-Whitney
- d) Teste Exato de Fisher
- e) Teste Qui-Quadrado
- f) Coeficiente de correlação de Spearman
- g) Teste de Diferença Entre Duas Proporções.

8 CONTINUIDADE DO ESTUDO

8.1 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

A extração de DNA foi realizada de acordo com Vicente (2000) adaptado para bactérias, conforme citado por Moreira *et al.*, (2007). As amostras foram previamente inoculadas em caldo BHI e incubadas por 24h a 36°C em ambiente de microaerofilia. Após este período as culturas foram centrifugadas a 12.000 RPM por 2 minutos e o sedimento transferido a um ependorf contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1, em 600µL de CTAB. Em seguida foram aplicados três pulsos (de 30 seg) de ultra-som (potência 70Hz), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, sob banho de gelo, utilizando desruptor de célula ultrassônico (marca Unique).

Foram, então, adicionados 400 µL de CTAB e as amostras incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) e os ependorfs centrifugados a 12.000 RPM por 7 min. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000 µL de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000 µL de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os ependorfs incubados a -20°C por 12 horas (“over night”) para precipitação dos ácidos nucléicos, e após este período foram centrifugados a 12.000 RPM por 7 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado e repetida a centrifugação a 12.000 RPM por 7 min. O álcool foi retirado e os ependorfs vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 100µL de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os ependorfs foram deixados à temperatura ambiente por 24h e armazenados a 4°C.

A integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em luz UV. Os resultados obtidos a partir da extração de DNA bacteriano podem ser observados nas Figuras 8, 9, 10 e Tabela 3 (ANEXO F).

8.2 Isolamento de Leveduras do Gênero *Candida* a Partir de Amostras de Saliva

As amostras foram processadas no Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Com o auxílio de uma micropipeta, 0,1 mL da amostra transportada em Caldo Saboraud Dextrose foi semeada em placa contendo o meio Agar Saboraud Dextrose. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 48 horas até sete dias.

8.2.1 Identificação de Leveduras do Gênero *Candida*

Após o período de incubação foi verificado se houve o desenvolvimento de colônias de leveduras. A primeira análise foi realizada pelas características macroscópicas das colônias que apresentaram crescimento (Fig. 5). As colônias de *Candida* spp têm como características serem esféricas, com superfície lisa, bordas regulares, de coloração branco-fosca, cremosas, com aspecto de porcelana e apresentando diâmetro entre 1 a 8 mm. As colônias que apresentaram tais características foram submetidas à Coloração de Gram e observadas em microscópio óptico (Nikon/YS2-T). Confirmada a micromorfologia leveduriforme (Fig. 6), uma colônia de cada placa foi repicada para um tubo contendo Agar Batata Dextrose e outro tubo contendo Agar Saboraud Dextrose. Todos os isolados foram mantidos em Agar Saboraud Dextrose e repicados, em média, uma vez por mês. Para a identificação das leveduras isoladas foram usados três métodos distintos:

- a) Formação do Tubo Germinativo,
- b) Agar Hicrome *Candida* (Himedia ®)
- C) Sistema API 20 C AUX (bio Mérieux ® SA).

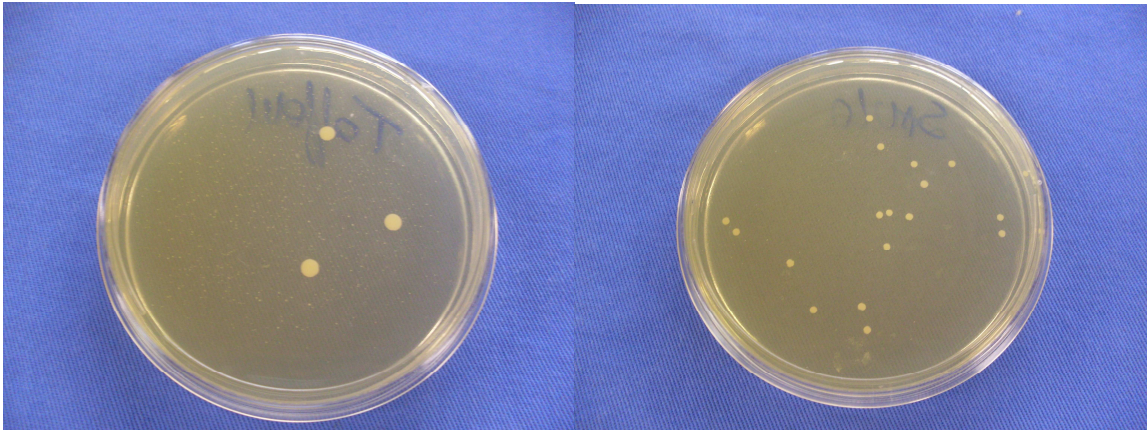


Figura 5 – Placas contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose com o padrão de crescimento característico de colônias de *Candida spp.*

Fonte: Foto do autor

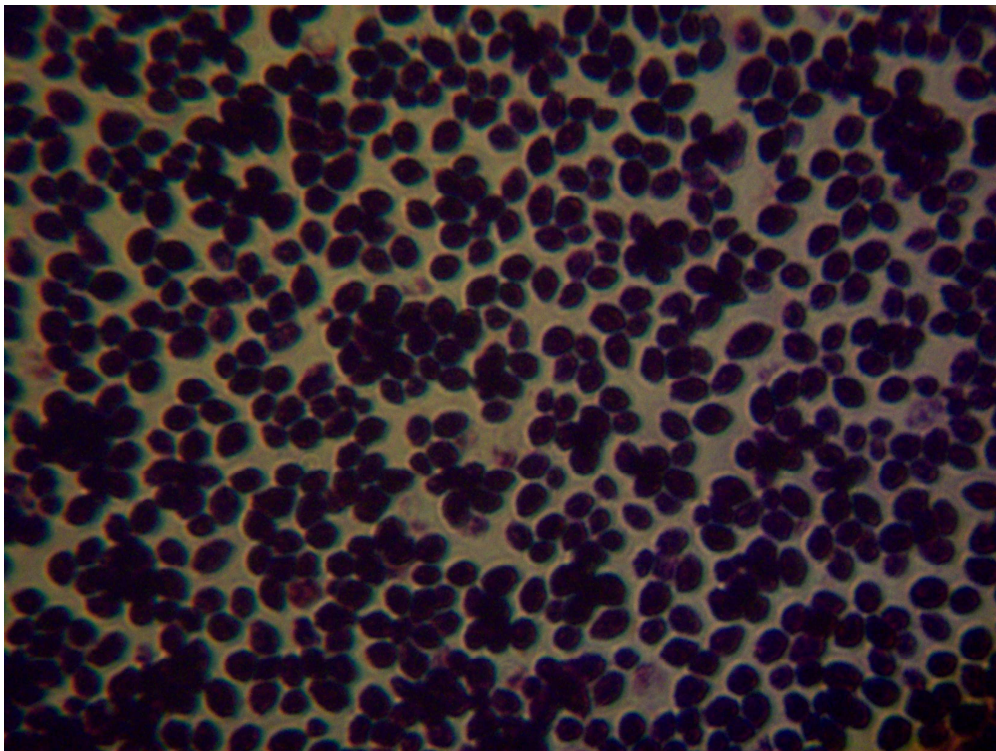


Figura 6 – Fotomicrografia em aumento de 1000x em óleo de imersão demonstrando micromorfologia leveduriforme.

Fonte: Foto do autor

8.2.1.1 Formação do Tubo Germinativo

Para a realização deste teste foram utilizadas colônias crescidas em 24 horas em Agar Batata Dextrose. Em seguida foi utilizado 0,5 ml de plasma de coelho, depositado em tubo esterilizado, acrescido de traços de dextrose e uma alçada da amostra que estava sendo analisada. O tubo foi incubado em estufa a 37°C por três horas. Para a visualização da micro morfologia, uma gota da cultura em suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio óptico (Nikon/YS2-T).

8.2.1.2 Agar Hicrome *Candida* (Himedia ®)

Foram utilizadas colônias crescidas até 48 horas em Agar Saboraud Dextrose. As colônias foram repicadas, em estrias, em placas contendo o meio com a mistura cromogênica. Os resultados foram observados pelo crescimento das colônias com cores distintas. Segundo as instruções do produto as cores são:

- a) *Candida albicans*: verde clara
- b) *Candida tropicalis*: azul clara
- c) *Candida krusei*: branca cremosa
- d) *Candida glabrata*: rosa

8.2.1.3 Sistema API 20 C AUX (bio Mérieux ® SA)

Para a realização deste teste foram utilizadas colônias novas (24 horas) repicadas em Agar Saboraud Dextrose. Primeiramente, foi feita a transferência de uma pequena

quantidade da colônia para um tubo contendo cerca de 1 ml de solução fisiológica esterilizada (API nasceu 0,85%) e então a diluição foi ajustada a uma turbeis equivalente ao tubo 2 da escala de Mc farland. Em seguida 100 µL desta suspensão foram adicionados ao meio basal do sistema API 20C Aux (API C Medium) e homogeneizado (Vortex QL-901/Biomixer). A seguir gotas desta suspensão foram usadas para preencher os 20 poços do painel de identificação, que foram formados por 19 carboidratos diferentes (D-glucose, glicerol, cálcio-2-ceto-gluconato, L-arabinose, D-xilose, adonitol, xilitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, Metil- α -D-glucopiranosido, N-acetil-glucosamina, D-celobiose, D - lactose, D - maltose, D - sacarose, D-trealose, D-melezitose e D-rafinose) e um controle negativo. O painel foi incubado em câmara úmida por 72 horas, quando então foi realizada a leitura. Foi considerado como resultado positivo à presença de opacidade nos poços, enquanto os resultados negativos foram mostrados pela ausência de opacidade. Um código de quatro dígitos foi obtido e utilizado como título, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do programa de identificação ApiWeb TM.

ANEXO E – TABELA DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA HEMOGRAMA

Tabela 5 – Valores médios para exames hematológicos dos pacientes portadores de AF e valores de referência para estes dados

HEMOGRAMA	MÉDIA 1	MÉDIA 2	MÉDIA 3	MÉDIA TOTAL	VALORES DE REFERÊNCIA
ERITRÓCITO (milhões/mm ³)	3,11	3,09	3,09	3,10	4,07 - 5,37
HB (g/dL)	10,36	10,12	10,28	10,25	10,9 – 14
VG (%)	30,14	30,06	30,10	30,10	33,4 – 44,5
VCM (fL)	95,06	95,67	97,45	96,06	72,9 – 85,2
HCM (pg)	33,23	33,03	33,34	33,20	29,9 – 31,7
CHCM (%)	34,28	33,64	34,24	34,05	32,2 – 34,2
RDW (%)	16,32	15,04	15,95	15,77	11,5 – 14,5
LEUCÓCITOS (milhões/mm ³)	2790,53	2806,94	3005,06	2867,51	4800 - 11.900
BASÓFILO (%)	0,07	0,10	0,11	0,09	0 – 1
EOSINÓFILO (%)	2,07	1,70	1,39	1,72	1 – 3
BLASTOS (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0
PROMIELO (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0
MIELÓCITO (%)	0,10	0,00	0,07	0,06	0
METAMIELÓCITO (%)	0,13	0,03	0,11	0,09	0
BASTONETE (%)	5,07	4,03	4,46	4,52	0 – 0,7
SEGMENTADOS (%)	25,90	25,93	27,61	26,48	54 – 62
NEUTRÓFILOS (%)	31,26	29,53	32,39	31,06	40 – 70
LINFÓCITOS (%)	58,07	61,77	59,46	59,77	25 – 33
LINFOS ATÍPICOS (%)	0,26	0,00	0,11	0,12	0
MONÓCITOS (%)	7,13	6,86	6,36	6,78	0,5 – 5,0
PLAQUETAS	48677,42	50966,67	48500,00	49381,36	140.000 – 450.000
MPV (fL)	10,63	10,12	9,84	10,20	7,5 – 9,0
GLICOSE (mg/dL)	93,92	100,60	98,40	97,64	60 – 99
CREATININA	0,67	0,70	0,70	0,69	0,6 - 0,9
BILIRRUBINA TOTAL	0,68	0,71	0,71	0,70	0,00 - 1,2
BD	0,26	0,30	0,28	0,28	0,00 - 0,40
BI	0,42	0,45	0,44	0,43	0,00 – 0,8
FOSFATASE ALCALINA	307,90	34,23	324,31	222,15	80 – 300
GOT	38,25	33,84	41,48	37,86	4 – 36
GPT	53,61	44,76	57,04	51,80	4 – 32
HB FETAL	14%	6,8%	5%	8,60%	< 1%

Fonte: Para valores médios – prontuários médicos dos pacientes

Para valores de referência – Dicionário de Especialidades Farmacêuticas / 2009.

ANEXO F – CONTINUIDADE DO ESTUDO

RESULTADOS DA EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO:

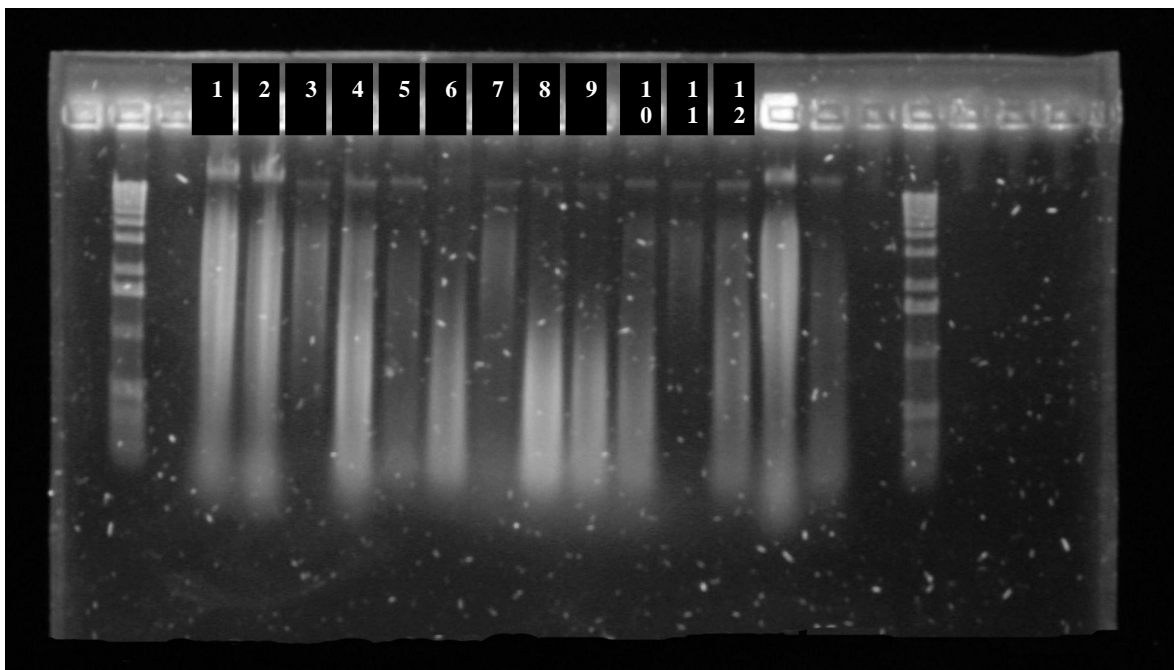


Figura 7 – Fotografia do Primeiro Gel de Agarose, as caixas numeradas demonstram as amostras utilizadas e são equivalentes as posições da Tabela 3.

Fonte – Foto do autor

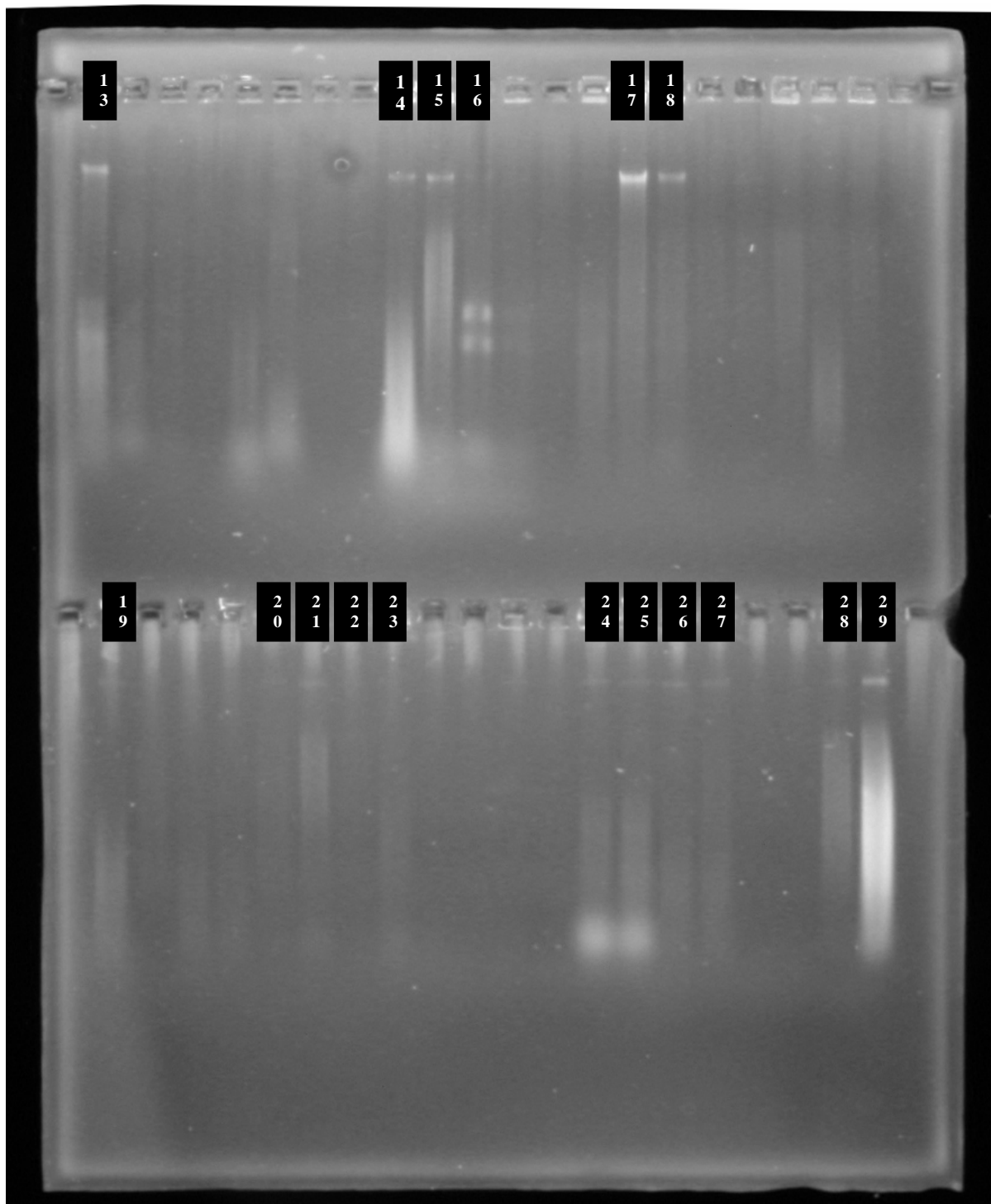


Figura 8 – Fotografia do Segundo Gel de Agarose, as as caixas numeradas demonstram as amostras utilizadas e são equivalentes as posições da Tabela 3.

Fonte – Foto do autor

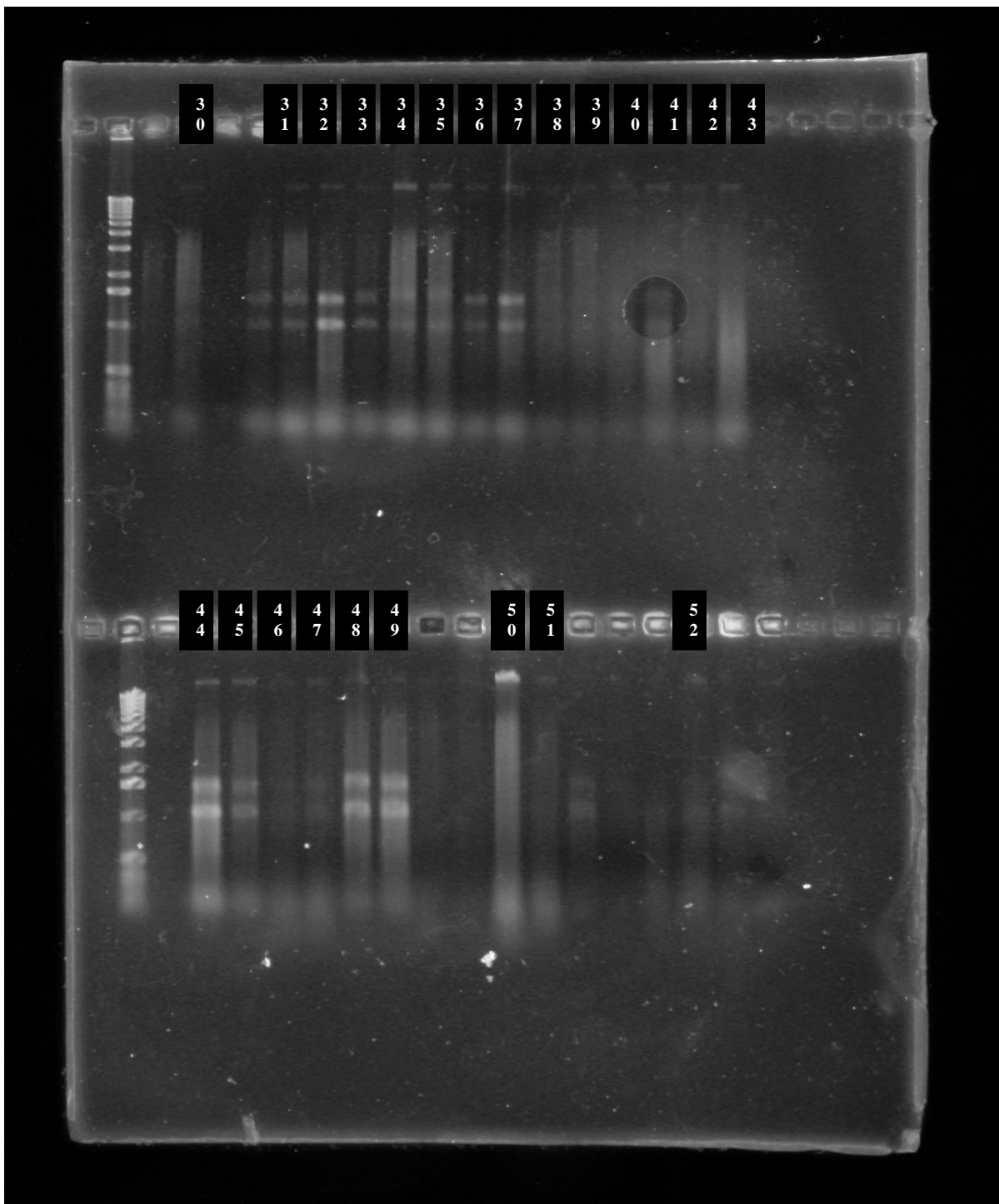


Figura 9 – Fotografia do Terceiro Gel de Agarose, as caixas numeradas demonstram as amostras utilizadas e são equivalentes as posições da Tabela 3.

Fonte – Foto do autor

Tabela 6 – Resultados da Extração de DNA

ISOLADOS	SÍMBOLO	N. CANALETA	CONCENTRAÇÃO DNA					
			10NG	30NG	50NG	100NG	150NG	300NG
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	CP10	1					X	
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	CP10*	2					X	
S. mitis / S. oralis / S. salivarius	G8	3			X			
S. mitis / S. oralis / S. salivarius	G8*	4				X		
S. oralis / S. salivarius	D5	5				X		
S. oralis / S. salivarius	D5*	6	X					
Nenhum	EV3	7			X			
Nenhum	EV3*	8			X			
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	JAC3	9			X			
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	JAC3*	10			X			
S. mutans	NA6	11	X					
S. mutans	NA6*	12				X		
S. sobrinus	S7	13					X	
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	Y5	14			X			
S. crista / S. gordoni / S. oralis / S. sanguinis	Y5*	15				X		
S. mitis / S. oralis / S. salivarius	D4	16	X					
S. sanguinis bio 2	CP7	17						X
S. sanguinis bio 2	CP7*	18					X	
Nenhum	AP6B	19	X					
S. crista / S. salivarius / S. vestibularius	MP3	20	X					
S. crista / S. salivarius / S. vestibularius	MP3*	21		X				
S. mutans / S. sobrinus / S. macacae	RA7	22	X					
S. mutans / S. sobrinus / S. macacae	RA7*	23	X					
S. crista / S. salivarius / S. vestibularius	AP1F	24		X				
S. crista / S. salivarius / S. vestibularius	AP1F*	25		X				
S. mutans	EC9	26		X				
S. mutans	EC9*	27		X				
Nenhum	DE5	28	X					
Nenhum	DE5*	29					X	
S. mutans / S. sobrinus	C6	30	X					
Nenhum	A7	31		X				
Nenhum	R9	32			X			
Nenhum	R9*	33		X				
S. oralis / S. salivarius	D5	34					X	
S. oralis / S. salivarius	D5*	35				X		
S. sobrinus / S. downei / S. ferus	EC2	36		X				
S. sobrinus / S. downei / S. ferus	EC2*	37		X				
Nenhum	EG2	38		X				
Nenhum	EG2*	39		X				

S. uberis / S. parauberis / S. sanguinis bio 2	EV6*	41		X				
S. gordonii / S. parassanguinis / S. sanguinis bio 2	JAQ10	42		X				
S. gordonii / S. parassanguinis / S. sanguinis bio 2	JAQ10*	43		X				
S. parassanguinis	F5	44				X		
S. parassanguinis	F5*	45				X		
S. acidominimus	S9	46	X					
S. acidominimus	S9*	47	X					
S. uberis / S. parauberis	EV2	48		X				
S. uberis / S. parauberis	EV2*	49		X				
S. parassanguinis	MC7P	50						X
S. parassanguinis	MC7P*	51			X			
Nenhum	AP6P*	52	X					

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: amostras selecionadas para realização de sequenciamento genético

ANEXO G – TABELA DE PROVAS BIOQUÍMICAS

Tabela 7 – Identificação das espécies de microrganismos por meio de provas bioquímicas para cada paciente.

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
A7	0	1	1	1	0	0	1		<i>nenhum</i>			
AP6	0	1	1	0	0	1	0		<i>Nenhum</i>			
CP1	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
DE1	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
DE5	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
EC4	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
Egli2	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>Nenhum</i>			
EV3	0	1	0	1	1	0	1		<i>Nenhum</i>			
F1	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
JU5	0	1	1	1	1	0	1		<i>Nenhum</i>			
MA6	0	1	1	0	0	1	1		<i>Nenhum</i>			
MTP1	0	1	1	1	1	0	1	1	<i>Nenhum</i>			
MTP6	0	1	0	1	1	0	0		<i>Nenhum</i>			
R3	0	1	1	1	1	0	1		<i>Nenhum</i>			
R5	0	1	1	1	0	0	1		<i>Nenhum</i>			
R6	0	1	1	1	0	0	1		<i>Nenhum</i>			
R9	0	1	1	0	1	1	1		<i>Nenhum</i>			
Ra4	0	1	1	1	0	0	1		<i>Nenhum</i>			
W1	0	1	1	0	0	1	1		<i>Nenhum</i>			
W2	0	1	1	1	0	0	1		<i>Nenhum</i>			
W4	0	1	1	0	1	1	1		<i>Nenhum</i>			
W6	0	1	1	0	0	1	0		<i>Nenhum</i>			
W8	0	1	0	1	1	0	1		<i>Nenhum</i>			
A10	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>S. rattus</i>			
A8	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CM2	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CM3	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CM7	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
CM9	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CO10	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CO5	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
CO9	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
F7	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
F9	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
G3	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
GG6	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
JU1	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
JU4	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
K6	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
MA4	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
MA7	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
NA10	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
NA3	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
NA4	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
NA8	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
R1	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
Ra8	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
Ra9	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
V3	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>S. rattus</i>			
V4	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>S. rattus</i>			
V7	0	1	1	1	0	1	1	1	<i>S. rattus</i>			
W9	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
WL7	0	1	1	1	0	1	1		<i>S. rattus</i>			
AC10	0	1	1	0	0	0	0		<i>S.acidominimus</i>			
DE2	0	1	1	0	0	0	0		<i>S.acidominimus</i>			
DE3	0	1	1	0	0	0	0		<i>S.acidominimus</i>			
DE9	0	1	1	0	0	0	0		<i>S.acidominimus</i>			
EC10	0	1	1	0	1	0	1		<i>S.acidominimus</i>			
Egli3	0	1	1	0	1	0	1		<i>S.acidominimus</i>			

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
F4	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
MTP2	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S10	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S2	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S3	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S4	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S5	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S6	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S8	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
S9	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
SA5	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
Y6	0	1	1	0	0	0	0		<i>S. acidominimus</i>			
A4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
AC2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
AC9	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
AP4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
AP5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
CM5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
CM6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
CP10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
D2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
D8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
DE10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
DE6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
DE7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
EC5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
Egli1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
F2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
F3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
F6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
G2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>
GG1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S. crista</i>	<i>S. gordonii</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguis bio3</i>

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCALINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
GG10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
GG2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
GG3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
GG5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
GG7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
GG8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
J2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
J3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
J4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
J7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
J9	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
K9	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MA1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MA2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MA3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MA8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MC10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MC2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MC4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MC5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MC8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
MTP4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
N3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
N6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Ra3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
SA1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
SA10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
SA3	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
SA6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
SA8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
SA9	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
V6	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
W7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
WL10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y1	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y10	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y2	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y4	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y5	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y7	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y8	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
Y9	0	1	0	0	0	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.gordonii</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.sanguis bio3</i>
AC7	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP1	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP2	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP3	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP7	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP8	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AP9	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
D1	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
D10	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
DE8	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
Egli7	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
Egli9	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
F8	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
MC3	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
MTP3	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
MTP5	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
MTP7	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
Ra6	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
SA2	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
SA4	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
SA7	0	1	0	0	1	0	0		<i>S.crista</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.vestibularis</i>	
AC8	0	1	0	0	0	0	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>		
F10	0	1	0	0	0	0	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>		
R8	0	1	0	0	0	0	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>		
A2	0	1	0	0	0	1	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio1</i>	<i>S.sanguis bio2</i>
A5	0	1	0	0	0	1	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio1</i>	<i>S.sanguis bio2</i>
N7	0	1	0	0	0	1	1		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio1</i>	<i>S.sanguis bio2</i>
AC3	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
EC1	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Egli4	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Egli6	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Egli8	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
J10	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Ra1	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Ra2	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
Ra5	0	1	0	0	0	1	0		<i>S.gordonii</i>	<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
EC8	0	1	0	1	1	1	1		<i>S.mitis</i>			
JU2	0	1	0	1	1	1	1		<i>S.mitis</i>			
V8	0	1	0	1	1	1	1		<i>S.mitis</i>			
AP10	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
D3	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
D4	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
D7	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
Egli5	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
G1	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
G6	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
G8	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
J5	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
J6	0	1	0	0	1	1	1		<i>S.mitis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>	
C10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C3	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C4	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C6	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C7	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C8	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
C9	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
JU8	0	1	1	1	1	1	1	0	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>		
Ra7	0	1	1	1	1	1	1	0	<i>S.mutans</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S. macacae</i>	
A3	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
A6	0	1	1	1	1	1	1	0	<i>S.mutans</i>			
A9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CM1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CM10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CM4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CM8	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO2	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO3	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO6	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO7	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CO8	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
CP4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
DE4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
EC9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
EV4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
EV7	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
EV8	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
EV9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
G4	0	1	1	1	1	1	1	0	<i>S.mutans</i>			

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCALINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
GG9	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
JU10	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
JU3	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
MA10	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
MA5	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
MA9	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
MC1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N2	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N5	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
N8	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	0		
N9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA2	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA5	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA6	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA7	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
NA9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
R10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
R4	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
R7	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
V1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
V10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
V2	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
V5	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
V9	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		
W10	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
W3	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
WL1	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>			
WL2	0	1	1	1	1	1	1	1	<i>S.mutans</i>	1		

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
WL3	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
WL4	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
WL5	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
WL6	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
WL8	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
WL9	0	1	1	1	1	1	1		<i>S.mutans</i>			
J1	0	1	1	0	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>			
S7	0	1	1	0	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>			
Y3	0	1	1	0	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>			
CP2	0	1	1	1	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.downei</i>	
EC2	0	1	1	1	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.downei</i>	
EV1	0	1	1	1	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.downei</i>	
JU9	0	1	1	1	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.downei</i>	
S1	0	1	1	1	1	0	0		<i>S.sobrinus</i>	<i>S.ferus</i>	<i>S.downei</i>	
AC4	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
AC5	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
AC6	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
D5	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
D6	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
D9	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
EC3	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
EC6	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
EC7	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
Egli10	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
G10	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
G5	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
G7	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
G9	0	1	0	0	1	0	1		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
R2	0	1	0	0	1	1	0		<i>S.oralis</i>	<i>S.salivarius</i>		
A1	0	1	0	1	0	0	1		<i>S.parasanguis</i>			
CP5	0	1	0	1	0	0	1		<i>S.parasanguis</i>			
F5	0	1	0	1	0	0	0		<i>S.parasanguis</i>			

PACIENTES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA	ESPÉCIE 1	ESPÉCIE 2	ESPÉCIE 3	ESPÉCIE 4
J8	0	1	0	1	0	0	0		<i>S.parasanguis</i>			
MC7	0	1	0	1	0	0	0		<i>S.parasanguis</i>			
JU6	0	1	0	1		0	1		<i>S.parasanguis</i>	nenhum		
JU7	0	1	0	1	0	1	1		<i>S.parasanguis</i>	<i>S.sanguis bio1</i>	<i>S.sanguis bio2</i>	
CP6	0	1	0	1	0	1	0		<i>S.sanguis bio2</i>			
CP7	0	1	0	1	0	1	0		<i>S.sanguis bio2</i>			
AC1	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
C1	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
C2	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
C5	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
CP3	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
CP8	0	1	1	1	0	0	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
CP9	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
EV10	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
EV2	0	1	1	1	0	0	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
EV5	0	1	1	1	0	0	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
GG4	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
K4	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>S.uberis/parauberis</i>			
K5	0	1	1	1	0	0	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
MC6	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
MC9	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
Ra10	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
W5	0	1	1	1	0	0	0		<i>S.uberis/parauberis</i>			
EV6	0	1	1	1	0	1	0		<i>S.uberis/parauberis</i>	<i>S.sanguis bio2</i>		
ESPÉCIES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA				
<i>S.acidominimus</i>	0	1	1	0	0	0		0				
<i>S.acidominimus</i>	0	1	1	0	1	0		0				
<i>S.acidominimus</i>	0	1	0	0	0	0		0				
<i>S.acidominimus</i>	0	1	0	0	1	0		0				
<i>S.crista</i>	0	1	0	0	0	0	0	0				
<i>S.crista</i>	0	1	0	0	1	0	0	0				
<i>S.gordonii</i>	0	1	0	0	0	1	1	1				

ESPÉCIES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA
<i>S.gordonii</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>S.gordonii</i>	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>S.gordonii</i>	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>S.mitis</i>	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>S.mitis</i>	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	1	1	0	0
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	1	1	1	1
<i>S.oralis</i>	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	1	0	0	1	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	1	0	0	0	1
<i>S.parasanguis</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>S.salivarius</i>	0	1	0	0	1	1	1	1
<i>S.salivarius</i>	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>S.salivarius</i>	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>S.salivarius</i>	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>S.sanguis bio1</i>	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>S.sanguis bio1</i>	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>S.sanguis bio2</i>	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>S.sanguis bio2</i>	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>S.sanguis bio2</i>	0	1	0	1	0	1	1	1
<i>S.sanguis bio2</i>	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>S.sanguis bio3</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S.sanguis bio3</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>S.mutans</i>	0	1	1	1	1	1	0	0

ESPÉCIES	CATALASE	GRAM	MANITOL	SORBITOL	ARGININA	RAFINOSE	MELIBIOSE	ESCULINA
<i>S.mutans</i>	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>S.mutans</i>	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>S.mutans</i>	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>S.sobrinus</i>	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>S.sobrinus</i>	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>S.sobrinus</i>	0	1	1	1	1	1	0	0
<i>S.sobrinus</i>	0	1	1	0	1	1	0	0
<i>S. cricetus</i>	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>S. cricetus</i>	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>S. downei</i>	0	1	1	1	1	0	0	0
<i>S. ferus</i>	0	1	1	1	1	0	0	1
<i>S. macacae</i>	0	1	1	1	1	1	0	1
<i>S. rattus</i>	0	1	1	1	0	1	1	1
<i>S.uberis/parauberis</i>	0	1	1	1	0	1	0	1
<i>S.uberis/parauberis</i>	0	1	1	1	0	0	0	1
<i>S.vestibularis</i>	0	1	0	0	1	0	0	1

Fonte – Dados do estudo

LEGENDA:

0 – NEGATIVO

1 – POSITIVO

OBS – Os dados foram classificados em negativo (0) e positivo (1) de acordo com a tabela 1 de identificação bioquímica (ANEXO C) e cruzados utilizando programa Excel for Windows.

Os isolados identificados como “nenhum” são os representantes dos Grupos de Estreptococos não identificados bioquimicamente como pertencentes aos Grupos de Estreptococos já reconhecidos.