

Baixa prevalência de sorotipos de *Streptococcus mutans* e maus hábitos alimentares em estudantes universitários de odontologia: sorotipos de *Streptococcus mutans* e cárie em estudantes de odontologia

Low prevalence of *Streptococcus mutans* serotypes and poor eating habits in undergraduate dental students: *Streptococcus mutans* serotypes and caries in dental students

Floribeth Leon-Perez[✉], Sofia Velázquez-Estrella[✉], José Chin-Chan[✉], Victor Monteon^{✉*}

Universidade Autónoma de Campeche,
Campeche, México.

*vmmonteon@uacam.mx

Recebido: 21 de janeiro de 2025.

Aceito: 24 de junho de 2025.

Publicado: 02 de setembro de 2025.

RESUMO

A prevalência de cárie no sudeste do México entre pessoas de 20-24 anos é de 83,5%. Seu desenvolvimento é multifatorial, podendo incluir dieta cariogênica, higiene oral precária e educação em saúde limitada. O presente estudo preliminar longitudinal, simples-cego e de amostragem não probabilística buscou avaliar a higiene oral, a prevalência de *Streptococcus mutans* e a frequência de cáries em estudantes de odontologia. Participaram 67 estudantes no primeiro semestre e 54 no acompanhamento no segundo semestre. Questionários autoaplicáveis obtiveram informações sobre hábitos de higiene oral. Realizou-se CPOD para detectar cárie, cultura de placa supragengival do dente hígido 46 e PCR com primers específicos para *S. mutans* e seus sorotipos. O alto consumo de bebidas açucaradas excedeu 74%, a técnica de escovação de Bass foi a mais conhecida e a prevalência geral de cárie foi de 54%; o índice CPOD foi de 3,34 e 3,30 no primeiro e segundo semestres, respectivamente. O número de crescimento de colônias em ágar Mitis Salivarius foi maior no primeiro semestre ($Z=-4,8$, $p<0,0001$). A prevalência de *S. mutans* baseada em cultura foi de 85% e 44% no primeiro e segundo semestres, respectivamente. Em contraste, a confirmação por PCR mostrou taxas de prevalência de 41% e 37% para os mesmos períodos, com o sorotipo c representando 80%. Os estudantes de odontologia exibiram alto consumo de açúcar. A prevalência de cárie e *S. mutans* foi menor que a relatada para a população geral e nenhuma associação clara entre *S. mutans* e cárie foi observada.

Palavras-chave: Cuidados bucais. Sorotipos. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The prevalence of caries in southeastern Mexico in individuals aged 20 to 24 is 83.5%. Caries development is multifactorial, including a cariogenic diet, poor oral hygiene, and limited health education. This preliminary longitudinal, single-blind study, utilizing non-probability sampling, aimed to evaluate oral hygiene, *Streptococcus mutans* prevalence, and caries frequency in undergraduate dental students. Sixty-seven students in their first semester and fifty-four in their second semester follow-up participated. Self-administered questionnaires gathered data on oral hygiene habits. Additionally, caries diagnosis using DMFT, supragingival plaque culture from tooth 46, and PCR with specific primers for *S. mutans* and its serotypes were performed. Over 74% of participants reported a high consumption of sugary beverages, and the Bass brushing technique was the most known. The overall caries prevalence was 54%. The DMFT index was 3.34 and 3.30 in the first and second semesters, respectively. Colony growth on Mitis-Salivarius agar was significantly higher in the first semester ($Z=-4.8$, $p<0.0001$). Culture-based prevalence of *S. mutans* was 85% and 44% in the first and second semesters, respectively. In contrast, PCR confirmation showed prevalence rates of 41% and 37% for the same periods, serotype c accounting for 80%. Undergraduate dental students exhibited high sugar consumption. The prevalence of caries and *S. mutans* was lower than that reported for the general population, and no significant association between *S. mutans* and caries was observed.

Keywords: Oral care. Serotypes. *Streptococcus mutans*.

INTRODUÇÃO

As doenças bucais são prevalentes no México, de modo que a presença de resíduos e/ou cálculo dentário mostra-se como um indicador significativo de má higiene bucal, o que predispõe os indivíduos a cáries e outras condições bucais. De acordo com a Direção Geral de Epidemiologia do Ministério da Saúde do México, em 2021, 40% dos indivíduos com idade entre 20 e 24 anos demonstravam uma higiene bucal aceitável com base no Índice de Higiene Bucal Simplificado (SOHI). Por outro lado, 60% apresentavam resíduos e/ou cálculo dentário. Além disso, a prevalência de cárie nesse grupo etário era de 83,5% (INEGI, 2020).

A cárie dentária é uma doença crônica e multifatorial, influenciada por fatores como dieta cariogênica, higiene bucal deficiente, educação sanitária limitada, suscetibilidade do hospedeiro e composição da microbiota do biofilme (Duque-de-Estrada-Riverón, Pérez-Quifonez & Hidalgo-Gato-Fuentes, 2006; García-Cortés et al., 2014; Petersen et al., 2005). Um estudo

brasileiro demonstra que uma renda média mais alta está associada ao menor risco de cárie dentária, enquanto a baixa escolaridade materna e a má percepção da própria saúde bucal estão associadas a um risco aumentado de cárie dentária (Ruffo, Toledo & Machado, 2022). Crises econômicas afetam indivíduos desempregados, que têm maior probabilidade de sofrerem com cárie dentária e dentes ausentes. Indivíduos da classe trabalhadora correm maior risco de extrações dentárias, ao passo que pessoas com nível de escolaridade intermediário apresentam maior probabilidade de mobilidade dentária (Méndez, Román-Montero, Miguel, Rojo & López, 2022).

A educação em saúde e a higiene bucal têm sido amplamente estudadas em diversas populações, incluindo estudantes de odontologia, que frequentemente apresentam higiene bucal deficiente e com inflamação gengival variando de 30% a 66% (Aguilar-Díaz et al., 2021; Kawamura, Spadafora, Kim & Komabayashi, 2002; Qian et al., 2022).

A transição de uma condição dental/bucal saudável para uma condição de adoecimento ocorre quando a composição do biofilme dental muda para uma comunidade microbiana produtora e tolerante a ácidos. Estudos de metatranscriptômica revelaram microbiotas específicas para cada tecido. Por exemplo, em lesões de cárie no esmalte dentário, é observada a presença de *Streptococci*, *Rothia*, *Leptotrichia* e *Veillonella* em níveis mais elevados, enquanto *Lactobacillus*, *Shlegelella*, *Pseudoramibacter* e *Atopobium* são mais tipicamente associados a lesões na dentina. Em cáries no esmalte, os *Streptococci* representaram 40% da comunidade total (Simón-Soro, Guillén-Navarro & Mira, 2014).

Estudos identificaram uma abundância relativa de *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Prevotella* e *Mitsuokella* em dentes com cárie (Marsh, 2018). Embora a bactéria *Streptococcus mutans* esteja implicada no desenvolvimento da cárie e na formação do biofilme cariogênico, ela constitui apenas de 0,02% a 0,73% do total da comunidade bacteriana (Marsh, 2018; Simón-Soro et al., 2014). Apesar de sua baixa abundância relativa, a *S. mutans* continua sendo um agente etiológico chave na cárie dentária humana devido à sua capacidade de formar biofilmes aderentes e produzir ácido láctico, causador da erosão do esmalte dentário.

A *S. mutans* produz ativamente as enzimas glicosiltransferases extracelulares, que são cruciais para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis. Esses polissacarídeos desempenham um papel vital na formação do biofilme, facilitando a adesão à superfície do dente (Beighton, 2005; Gómez-García, López-Vidal, Pinto-Cardoso & Aguirre-García, 2022; Kristofferson et al., 1985; Loesche, 1986; Mattos-Graner, Klein & Smith, 2014; Wu et al., 2022).

A bactéria *S. mutans* é classificada em quatro sorotipos clínicos (*c*, *e*, *f* e *k*), com base na presença de polissacarídeo de ramnose-glicose em sua parede celular (Qin et al., 2003; Shibata et al., 2003). Os sorotipos *c* e *e* são responsáveis por 90% dos casos clínicos, sendo o sorotipo *c* o mais prevalente (Zheng et al., 2023). Os sorotipos *f* e *k* são mais invasivos para as células endoteliais humanas. Além disso, o sorotipo *k* pode interferir na agregação plaquetária, o que pode levar a acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos (Abranches et al., 2011).

A distribuição dos sorotipos de *S. mutans* varia de acordo com a raça, população, idade e contexto cultural. Por exemplo, um estudo com crianças afro-americanas em áreas rurais do Alabama relatou uma prevalência de 98% do sorotipo *c*, associado aos maiores índices de cárie em crianças mais velhas. O sorotipo *k*, por sua vez, foi estatisticamente mais prevalente em meninas (Momeni et al., 2019). Em contraste, um estudo com crianças iranianas e afegãs encontrou uma prevalência de 47,5% do sorotipo *c* e 8,1% do sorotipo *k* (Elyassi, Babaeekhou & Ghane, 2022).

Estudos em diversas populações têm demonstrado consistentemente variações na distribuição dos sorotipos de *S. mutans*. Em crianças colombianas, o sorotipo *c* foi o mais prevalente, com 73%, seguido do sorotipo *f*, com 16,3%, e do sorotipo *e*, com 10,5% (Rincón-Rodríguez, Parada-Sanchez, Bedoya-Correa & Arboleda-Toro, 2019). De forma semelhante, em uma população jovem da Galícia, o sorotipo *c* predominou com 86%, enquanto os sorotipos *e*, *k* e *f* representaram 8%, 3% e 2%, respectivamente (Rosero, Prado, Guirao & Santos, 2020).

Entre crianças em idade escolar de Córdoba, na Argentina, o sorotipo *c* foi novamente o mais prevalente, com 53,2%, seguido dos sorotipos *e*, *f* e *k*, com 31,9%, 8,5% e 6,4%, respectivamente (Carletto-Körber, González-Ittig, Jimenez & Cornejo, 2015). Já em crianças japonesas, o sorotipo *c* representou de 70% a 80% dos isolados; o sorotipo *e* representou 20% e os sorotipos *f* e *k*, menos de 5% cada (Nakano & Ooshima, 2009). Por fim, em adultos italianos com diabetes, 82% dos isolados eram do sorotipo *c*. O

sorotipo *k* não foi detectado (Angelis et al., 2016).

Dados existentes sugerem fortemente que a diversidade e a prevalência bacteriana são significativamente influenciadas por raça, idade, dieta, geografia e contexto cultural. Até o momento, nenhum estudo foi realizado no sudeste do México, onde predominam as populações mestiça e maia. O histórico genético da diversidade de HLA em populações humanas é relevante porque os loci de HLA podem desempenhar um papel na resposta imune a patógenos infecciosos e na inflamação. Nesse mesmo sentido, pesquisas recentes indicaram que a população maia de Yucatán e Chiapas, no México, pode ser agrupada em um clado específico (Barquera et al., 2020; Moreno-Estrada, 2014). O presente estudo teve como objetivo determinar os hábitos de higiene bucal e a prevalência de *S. mutans* e seus sorotipos em estudantes de odontologia em Campeche, no México.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra e delineamento do estudo

Este estudo foi conduzido na Faculdade de Odontologia da Universidade Autônoma de Campeche (UACAM), México. Dos 145 estudantes do primeiro semestre, 67 aceitaram participar; já em se tratando do segundo semestre, apenas 54 completaram o acompanhamento. Todos os voluntários receberam informações detalhadas sobre o estudo antes da inclusão. O consentimento, informado por escrito, foi obtido de cada participante, detalhando os objetivos da pesquisa, os benefícios profissionais, e garantindo a confidencialidade. Os critérios de inclusão foram: estudantes de odontologia do primeiro semestre (linha de base) e aqueles que continuaram no acompanhamento do segundo semestre. Os critérios de exclusão foram: doenças autoimunes, imunodeficiência, tratamento odontológico ou terapia com antibióticos em andamento, gravidez e doença periodontal grave.

A amostragem foi por conveniência, ou seja, não probabilística. Todos os procedimentos seguiram os padrões éticos da Declaração de Helsinque de 1964. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e Ética da UACAM (registros UACAM-080/UAC/2023 e CBI-08-2023-12). A presente pesquisa seguiu as diretrizes STROBE (Elm et al., 2007).

Questionários autoaplicáveis foram usados para coletar dados socioeconômicos, comportamentais e demográficos dos participantes. Os questionários incluíam perguntas sobre hábitos alimentares (tipos de refeições e frequência de consumo de bebidas açucaradas e lanches) e higiene bucal (técnicas de escovação: Bass, Bass modificado, Charter, Stillman; frequência do uso de fio dental e visitas ao dentista), conforme descrito anteriormente (Lara-Capi et al., 2018).

Diagnose de cárie: todos os participantes foram submetidos a exames bucais realizados sob luz natural, utilizando um espelho plano número cinco. Dois dentistas qualificados examinaram e confirmaram, de forma independente, a presença de cárie dentária com base no índice CPOD (Cariado, Perdido e Obturado).

Isolamento de estreptococos a partir de amostras clínicas

Amostras de placa supragengival foram coletadas da superfície vestibular do dente 46 com uma cureta estéril, raspando a superfície do esmalte, e transferidas para um tubo contendo 500 µl de caldo tioglicolato. Uma amostra de 25 µl do caldo inoculado foi então semeada em ágar Mitis-Salivarius (MSA), suplementado com 20% de sacarose e bacitracina, para o isolamento e identificação de *S. mutans*.

O ágar Mitis-Salivarius (MSA) foi preparado dissolvendo-se 90 g de MSA e 150 g de sacarose em 1000 ml de água destilada. Após a autoclavagem e resfriamento a 50 °C, foram adicionados

1000 µl de solução de telureto a 1% e 1000 µl de bacitracina a 3 mg/ml. As placas de ágar foram vertidas e deixadas para solidificar durante à noite, a uma temperatura ambiente, e isso foi seguido por uma incubação de 24 horas a 37 °C para confirmar a esterilidade. A partir das amostras de placa supragengival coletadas nos tubos com 500 µl de caldo tioglicolato, uma alíquota de 25 µl foi semeada em MSA e incubada em 5% de CO₂ a 37 °C por 48 horas.

S. mutans (ATCC 25175) foi incluído como controle positivo em cada experimento. Após a incubação, as colônias que exibiam morfologia semelhante à de *S. mutans* (por exemplo, aparência de vidro fosco, margens irregulares, coloração preto/azulada, crescimento enraizado e formações em estrela) foram contadas. Colônias com morfologias diferentes também foram contadas.

Identificação de bactérias

Cinco colônias com morfologia de *S. mutans* de cada placa positiva foram selecionadas e transferidas para 5 ml de meio BHI por 48 horas. Após a incubação, 2 ml da suspensão bacteriana foram centrifugados para formar uma *pellet*. O *pellet* foi transferido e ressuspensão em outro tubo com 300 µl de solução de lise. As amostras foram mantidas congeladas a -20 °C até o uso.

Os tubos contendo a solução de lise foram incubados com lizozima por uma hora, a 37 °C. Após a adição de 80 µl de solução de lise nuclear (Promega), as amostras foram incubadas a 80 °C por cinco minutos, o que foi seguido pela adição de 60 µl de solução de precipitação de proteínas e incubação a 4 °C, igualmente, por cinco minutos (Promega). As proteínas e os resíduos celulares foram removidos por centrifugação a 16.000 × g por três minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para a precipitação do DNA com álcool isopropílico. O *pellet* de DNA foi coletado por centrifugação a 16.000 × g por 20 minutos. Após lavar o DNA com etanol 70%, o *pellet* foi dissolvido e ressuspensão em 20 µl de solução de DNA (Promega) e armazenado a -20 °C até o uso.

Todas as amostras foram verificadas quanto à presença de DNA utilizando *primers* específicos para o RNA ribossômico. Foram usados os *primers* U16S-3-F (5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3') e U16S-4-R (5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATCTG TT-3'), que amplificam um produto de 466 bp. As condições da PCR foram: 95 °C por cinco minutos (desnaturação), seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 45 segundos (*annealing*), e 72 °C por 45 segundos (extensão), com uma extensão final a 72 °C por dez minutos (Zeng et al., 2020).

Identificação de *Streptococcus mutans*

As amostras positivas para o gene ribossomal foram analisadas para a presença de *S. mutans* utilizando dois conjuntos de *primers* específicos, que visam o *locus* htrA e uma região intergênica. Os *primers* Sm479F (5'-TCGCGAAAAAGATAACAAACA-3') e Sm479R (5'-GCCCTTCACAGTTGGTTAG-3') foram usados para amplificar um produto de 479 bp. As condições da PCR foram: 95 °C por cinco minutos (desnaturação), seguidos por 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos (*annealing*) e 72 °C por um minuto (extensão), com uma extensão final a 72 °C por dez minutos (Chen et al., 2007).

A segunda PCR para *S. mutans* foi realizada com *primers* específicos e desenhados a partir do gene *gtfB*. Os *primers* mut3368-F (GCC TAC AGC TCA GAG ATG CTA TTCT) e Smut3481-R (GCC ATA CAC CAC TCA TGA ATT GA) produzem um amplicon de 114 bp. As condições da reação de PCR foram: desnaturação do DNA a 94 °C por cinco minutos, seguida por 25 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por um minuto (Yoshida et al., 2003).

Identificação de sorotipos de *Streptococcus mutans*

Os seguintes pares de *primers* foram utilizados para amplificar sorotipos específicos de *S. mutans*: SC-F/SC-R (sorotipo c), produzindo um amplicon de 727 bp; SE-F/SE-R (sorotipo e), produzindo um amplicon de 517 bp; SF-F/SF-R (sorotipo f), produzindo um amplicon de 316 bp; e CEFK-F/CEFK-R (sorotipo k), produzindo um amplicon de 294 bp (Qin, 2003; Shibata, 2003; Zheng, 2023).

A mistura de PCR consistiu em 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 50 pMol de cada *primer*, 2 µL de DNA molde e 2,5 U de Taq DNA polimerase. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial do DNA a 96 °C por dois minutos, seguida por um total de 25 ciclos de PCR, em que cada ciclo consistiu em 15 segundos a 96 °C, 30 segundos de *annealing* a 61 °C e um minuto a 72 °C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Amplicons maiores que 300 bp foram resolvidos em géis de agarose a 1,5%, enquanto amplicons menores que 200 bp foram resolvidos em géis de agarose a 3%. Uma amostra de 15 µL foi carregada em cada poço, e a eletroforese foi realizada a 80 mA e 100 V por 30-45 minutos. Cada gel incluiu um controle em branco e *S. mutans* ATCC 25175 como controle positivo. Os géis foram corados com brometo de etídio, descorados e visualizados sob luz UV.

Análise estatística

Os dados descritivos foram apresentados como porcentagens e frequências. As comparações não paramétricas foram realizadas utilizando o teste do qui-quadrado para variáveis categóricas (nível de significância $p < 0,05$). A análise bivariada incluiu o teste de Wilcoxon para dados pareados ordinais e quantitativos. Os dados foram analisados com os programas SPSS (versão 15) e GraphPad Prism (versão 10.2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere aos estudantes do primeiro ano, 67 participaram inicialmente, dos quais 54 completaram o acompanhamento. A idade média foi de 18,1 anos (DP ± 1,09) para o grupo inicial e 18,7 anos (DP ± 1,13) para o grupo de acompanhamento. No primeiro semestre, 40 (60%) participantes eram do sexo feminino e 27 (40%) do sexo masculino. No acompanhamento, 67% eram mulheres e 33% eram homens.

Em se tratando de nossa universidade pública, os estudantes de odontologia e medicina geralmente vêm de famílias de classe média a alta, com apenas 10% deles estudando e trabalhando ao mesmo tempo. Apesar de gozarem de um estilo de vida “melhor”, seus hábitos de saúde e alimentares ainda são influenciados pela cultura local. No que diz respeito à amostra do presente estudo, 12% se identificaram como maias e o restante, como mestiços. Dentro da área de estudo, indivíduos de ascendência maia ainda representam um demográfico significativo, com até 60% de falantes nativos em certas regiões, embora representem 10% da amostra total.

Na Península de Yucatán, México, os dois principais grupos populacionais são os mestiços e os descendentes de maias. O histórico genético da diversidade de HLA em populações humanas é relevante porque os *loci* de HLA podem desempenhar um papel na resposta imune a patógenos infecciosos e na inflamação. Estudos recentes indicaram que a população maia de Yucatán e Chiapas, no México, pode ser agrupada em um clado específico (Barquera et al., 2020; Moreno-Estrada, 2014). Notavelmente, durante a recente pandemia da Covid-19, alelos de HLA, protetores contra a Covid-19 grave, foram relatados na população maia (Hernández-

Doño et al., 2022). Por outro lado, pacientes com alelos ameríndios autóctones de Chiapas, no México, demonstraram uma propensão a taxas elevadas de Lúpus Eritematoso Sistêmico (Garcia-Silva et al., 2021). Portanto, a presente investigação se revela bastante importante, tendo em vista que a prevalência de *S. mutans* e seus sorotipos em populações mestiças e maias de Yucatán, México, ainda não foi documentada.

Mais de 74% dos estudantes relataram alto consumo de bebidas açucaradas no primeiro semestre, hábito que diminuiu para 58% na etapa de acompanhamento. Infelizmente, o México tem o maior consumo mundial de Coca-Cola. No que concerne à população do presente estudo, 43,9% relataram consumir esse tipo de bebida açucarada, seguido pelo chá preto (19,5%), uma bebida regional. Menos de 10% consumiam bebidas açucaradas pela manhã, mas quase 70% dos estudantes relataram consumi-las à noite. Esse hábito pode influenciar o crescimento de microrganismos em indivíduos com higiene bucal deficiente e a progressão da cárie.

Consequentemente, um número maior de colônias de *S. mutans* cresceu no ágar Mitis-Salivarius nos estudantes do primeiro semestre em comparação com a avaliação seis meses depois. O teste de Wilcoxon demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o horário de consumo de bebidas açucaradas não mostrou diferença significativa ($p = 0,87$). Apesar da diminuição no consumo de bebidas açucaradas durante o segundo semestre, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (teste de Wilcoxon, $p = 0,1$). Assim, os dados sugerem que esses hábitos não mudaram substancialmente no geral.

Em contraste, mais de 60% dos estudantes de odontologia raramente buscaram atendimento odontológico profissional, enquanto menos de 5% relataram procurar serviços odontológicos com frequência. Quando questionados sobre as técnicas de escovação, a técnica Bass foi identificada como o método mais conhecido e praticado, seguida pela Stillman. Ao comparar esses hábitos de saúde bucal, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na busca por atendimento odontológico ou técnica de escovação ($p = 0,86$).

Em relação à frequência da escovação, 50% dos estudantes do primeiro semestre relataram escovar os dentes após as refeições. No entanto essa prática diminuiu consideravelmente para 5,5% no segundo semestre, embora essa mudança não tenha sido estatisticamente significativa ($p = 0,15$). A redução observada no crescimento de colônias semelhantes a *S. mutans* no segundo semestre provavelmente resultou dessas mudanças de hábito, mesmo que a diferença não tenha alcançado significância estatística.

A prevalência de cárie foi de 54% entre os estudantes de odontologia examinados (Tabela 1). O índice CPOD foi de 3,34 para o primeiro semestre e 3,30 para o segundo semestre, o que é considerado moderado. A análise estatística não indicou uma associação significativa entre a ocorrência de cárie e a frequência de consumo de bebidas açucaradas, consumo de doces, ou procura de serviços odontológicos.

Ao comparar os hábitos alimentares entre os estudantes do primeiro e segundo semestres, um aumento significativo no consumo de doces foi observado exclusivamente no grupo do segundo semestre (teste de Wilcoxon: $Z = -5,6$, $p < 0,05$). A ausência de diferenças significativas pode ser devido ao tamanho da amostra, à duração da observação e à população específica estudada, que demonstrou certa consciência sobre a saúde bucal.

Indivíduos com higiene bucal inadequada são suscetíveis ao desenvolvimento de doenças orais. Mas o conhecimento devido e a conscientização sobre os riscos da má higiene bucal

podem, potencialmente, mitigar problemas de saúde bucal. Entre os estudantes de odontologia do primeiro e segundo semestres, a prevalência de cárie dentária foi de 54%, significativamente menor do que a média nacional de 83% relatada no México (INEGI, 2020). Essa diferença pode ser atribuída ao fato de a amostra pertencer a um grupo muito específico, isto é, estudantes de odontologia.

Tabela 1

Dados demográficos de hábitos de higiene bucal e de alimentação em estudantes de graduação em odontologia.

Variável	Categoria	Primeiro Semestre (n=67) n (%)	Segundo Semestre (n=54) n (%)
Idade	Anos (Média ± DP)	18,17 ± 1,09	18,78 ± 1,13
Sexo	Feminino	40 (60%)	36 (67%)
	Masculino	27 (40%)	18 (33%)
Frequência de consumo de bebidas açucaradas	Raramente	17 (25%)	22 (40,7%)
	Altamente	39 (58%)	23 (42,5%)
	Frequentemente	11 (16%)	9 (16,6%)
Frequência de consumo de doces	Raramente	45 (67%)	37 (68,5%)
	Altamente	20 (29,8%)	14 (25,9%)
	Frequentemente	2 (3%)	3 (5,5%)
Horário de consumo	Manhã	9 (13%)	4 (7,4%)
	Tarde	16 (23,8%)	13 (24,0%)
	Noite	42 (62,6%)	37 (68,5%)
Busca por atendimento odontológico	Não	8 (13,4%)	6 (11,1%)
	Raramente	34 (50,7%)	22 (40,7%)
	Regularmente	21 (31%)	23 (40,7%)
	Frequentemente	5 (7,4%)	3 (5,5%)
Técnica de escovação	Bass	43 (64%)	34 (62,9%)
	Charters	6 (9%)	4 (7,4%)
	Bass Modificada	7 (10%)	7 (12,9%)
	Stillman	11 (16%)	9 (16,6%)
Frequência de escovação	Duas vezes ao dia	24 (35%)	22 (40,7%)
	Após as refeições	35 (52%)	3 (5,5%)
	Três vezes ao dia	8 (11,9%)	23 (42,5%)
	Nenhuma	-	6 (11,1%)
Cárie (prevalência)	Sim	54%	54%

Fonte: Os autores.

Vários estudos exploraram o conhecimento, as práticas e as percepções de saúde bucal entre estudantes de graduação em odontologia no México, como exemplificado por um estudo publicado em 2021 (Aguilar-Díaz et al., 2021). Especificamente, Aguilar-Díaz et al. (2021) descobriram que estudantes do segundo ano apresentavam maior frequência de práticas preventivas, que diminuía à medida que avançavam no programa acadêmico. Todavia, em se tratando do presente estudo, não foram observadas diferenças estatísticas neste aspecto.

A presença de colônias semelhantes a *S. mutans*, caracterizadas por uma aparência de vidro fosco, margens irregulares, coloração azul-escuro, crescimento enraizado no ágar e morfologia em forma de estrela (Figura 1), foi avaliada em ágar Mitis-Salivarius (MSA).

No grupo inicial de estudantes do primeiro ano, 85% (57/67) apresentaram crescimento. Seis meses depois, no grupo de acompanhamento, a taxa de detecção diminuiu de maneira significativa para 44% (24/54). Além disso, a contagem total de colônias em ágar MSB foi substancialmente maior no grupo de estudantes do primeiro ano em comparação com o de acompanhamento. Essa diferença foi significativa, conforme determinado pelo teste de Wilcoxon ($Z = -4,8$, $p < 0,0001$). Mesmo considerando que nem todas as colônias eram necessariamente *S. mutans*, ficou claro que, no segundo semestre, os estudantes

apresentaram menor desenvolvimento bacteriano semelhante a *S. mutans*.

É notável que a prevalência de colônias semelhantes a *S. mutans* foi de 85% entre os estudantes de odontologia do primeiro semestre, diminuindo para 44% seis meses depois. Embora o ágar Mitis-Salivarius (MSA) seja amplamente utilizado em pesquisas clínicas e epidemiológicas, ele não é seletivo apenas para *S. mutans*. Consequentemente, outras espécies bacterianas, como *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *Phytobacter*, *S. epidermidis* e *E. kobei*, também são capazes de crescer nesse meio de cultura.

Por conseguinte, é imperativo ter cautela durante a quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) para evitar a superestimação potencial das populações de *S. mutans*, visto que nem todas as colônias que se desenvolvem em ágar MSB são atribuíveis a *S. mutans*. O uso de métodos moleculares, como a PCR, é útil para essa diferenciação (Zeng et al., 2020).

Além disso, pesquisas indicam que aproximadamente 57% das UFCs observadas em ágar MSB podem corresponder a espécies de estreptococos que não são *S. mutans* (Shibata et al., 2003). Vale destacar que esse estudo confirmou a identidade das colônias semelhantes a *S. mutans* por meio de PCR. A comparação entre os dois procedimentos revelou uma sensibilidade de 100%, especificidade de 73%, um valor preditivo positivo de 56% e um valor preditivo negativo de 100%.

Ao contrário do esperado, não houve correlação ou diferença estatisticamente significativa entre a presença de cárie e a presença de *S. mutans*. Não obstante, o paradigma da etiologia da cárie mudou: ela não é mais atribuída a um único patógeno (como *S. mutans*), mas entendida como uma consequência da disbiose ecológica no microbioma oral.

O consumo frequente de açúcar impulsiona a seleção de espécies acidogênicas e acidofílicas, resultando na diminuição da diversidade microbiana e em um ambiente ácido que promove a desmineralização. Como consequência, as estratégias de prevenção e tratamento estão evoluindo para focar na restauração da homeostase oral, afastando-se da eliminação microbiana completa via antibióticos ou da ação direcionada a patógenos específicos. Isso envolve fomentar uma microbiota saudável e modular o ambiente bucal para melhorar a remineralização e controlar o crescimento de patógenos (Ballón-Salcedo, Cacya-Apaza & Valdivia-Silva, 2021).

As colônias bacterianas foram submetidas à análise por PCR usando conjuntos de *primers* que visam o gene *gtfB* e o *locus htrA* de *S. mutans*. No grupo inicial de estudantes de odontologia do primeiro semestre, o gene *gtfB* foi detectado em 40,2% (27/67) das amostras, resultando em um produto de 114 bp. O *locus htrA* foi identificado em 35,8% (24/67) das amostras, gerando um amplicon de 479 bp. Seis meses depois, a prevalência diminuiu significativamente, com o gene *gtfB* detectado em 22,2% (12/54) e o *locus htrA* em 18,5% (10/54) das amostras (Figura 2).

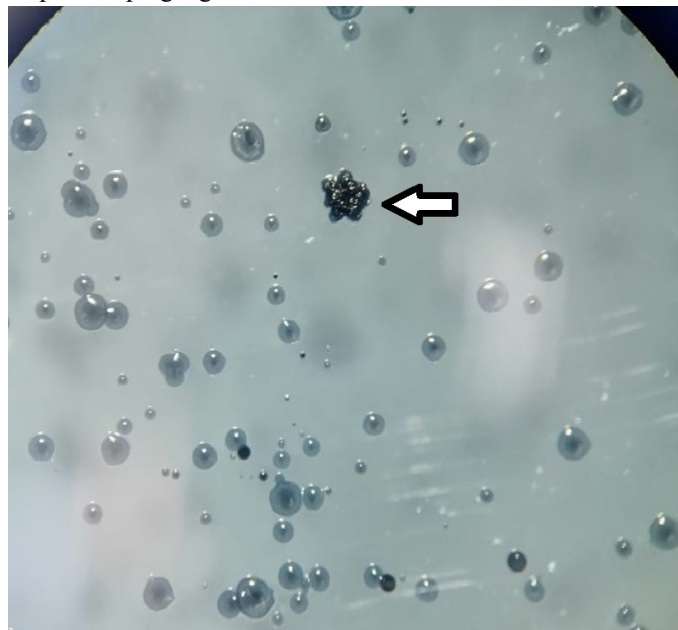
Em vista disso, ferramentas de diagnóstico molecular, como a PCR, que emprega *primers* específicos para genes de *S. mutans*, representam uma abordagem mais precisa e confiável em comparação com o ágar MSB, que exibe um valor preditivo positivo de 56%. Utilizando ensaios de PCR específicos, a presente investigação demonstrou uma prevalência de *S. mutans* de 41% nos estudantes do primeiro semestre, que diminuiu para 37% após um intervalo de seis meses. Em um contexto comparativo, um estudo recente relatou uma prevalência de 66,7% de *S. mutans* em adultos indianos, de 18 a 35 anos, com cárie dentária e de 42,7% em indivíduos sem cárie dentária (Praveen et al., 2024).

Cabe ressaltar que a prevalência de *S. mutans* observada na amostra do presente estudo é menor que a documentada anteriormente em outras populações. Uma potencial explicação

para essa discrepância reside nas diferentes origens genéticas e/ou em variáveis de saúde bucal, sociais e econômicas quando comparadas às de estudantes de odontologia.

Figura 1

Imagens representativas do crescimento de colônias semelhantes a *Streptococcus mutans* em ágar Mitis-Salivarius (MSA) a partir de placa supragengival de dentes saudáveis.



Fonte: Os autores.

Nota. Colônias com aspecto de vidro fosco, margens irregulares, coloração azul-escura, crescimento enraizado no ágar e formato de estrela, foram consideradas como *S. mutans*.

A porcentagem total de testes de PCR positivos foi de 41,7% (28 de 67) para estudantes do primeiro semestre e 24% (13 de 54) para estudantes do segundo semestre. A identificação de *S. mutans* baseada em PCR, usando *primers* que visam o gene *gtfB*, demonstrou maior sensibilidade em comparação com os *primers* que visam o *locus htrA*.

Assim é que essa investigação revelou uma prevalência geral de *S. mutans* de 39% e uma prevalência de cárie dentária de 54% entre estudantes de graduação em odontologia no México. Entretanto, uma observação significativa revelou que apenas 21% dos estudantes diagnosticados com cárie também apresentavam *S. mutans*.

Esses dados sugerem que a prevalência de *S. mutans* depende fortemente da população específica em estudo. Em contraste, dados da Direção Geral de Epidemiologia do Ministério da Saúde do México (INEGI, 2020) indicam uma prevalência de cárie dentária de 83,5% na mesma faixa etária.

Esses achados contrastantes reforçam a ideia de que a prevalência de *S. mutans* é significativamente afetada pelo nível de educação prévia em saúde bucal.

Após o isolamento de colônias com resultados positivos para o gene *gtfB* ou o *locus htrA* de *S. mutans*, a amplificação por PCR foi realizada para a identificação dos sorotipos.

O sorotipo *c* foi predominante, representando 75% dos isolados em estudantes do primeiro semestre e 85% nos do segundo semestre, gerando um amplicon de 727 bp. O sorotipo *e* foi identificado em 25% e 15% dos isolados, respectivamente, resultando em um amplicon de 517 bp.

É notável que os sorotipos *f* e *k* não foram detectados na população estudada (Figura 3). Em se tratando do estudo em tela, o sorotipo *c* foi identificado como predominante, com taxas de prevalência variando de 75% a 85%. O sorotipo *e*, por sua vez,

exibiu taxas de prevalência entre 15% e 25%.

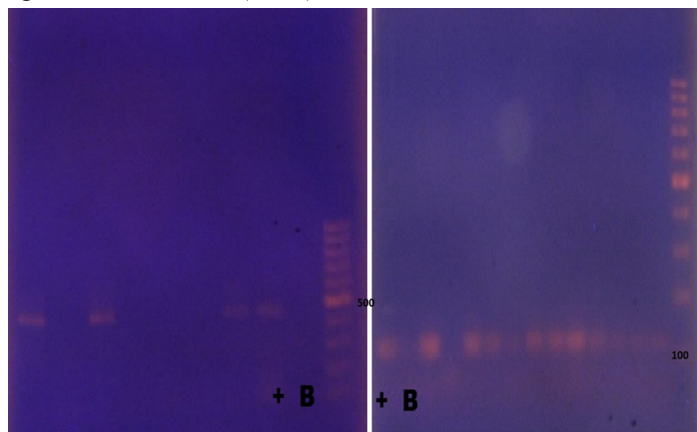
Os dados dessa investigação se assemelham aos relatados em populações japonesas, cuja prevalência do sorotipo *c* varia de 70% a 80% (Nakano & Ooshima, 2009), e em populações da Galícia, com uma prevalência de 86% para o sorotipo *c* (Saltos Rosero et al., 2020). No entanto, os resultados da presente pesquisa diferem daqueles observados em populações iranianas e argentinas, nos quais a prevalência do sorotipo *c* foi de 47,5% e 53,2%, respectivamente (Carletto-Körber et al., 2015; Elyassi et al., 2022).

Esses achados corroboram coletivamente a premissa de que a prevalência dos sorotipos de *S. mutans* é significativamente influenciada por fatores como raça, idade, localização geográfica e contexto cultural.

Apesar da ausência de evidências conclusivas sobre a relevância clínica dos sorotipos de *S. mutans*, a pesquisa existente indica que a variação de sorotipos, ou a origem genética, pode desempenhar um papel na modulação da formação do biofilme, especificamente em relação às propriedades acidúricas e às respostas à privação de nutrientes (Bedoya-Correa, Rincón-Rodríguez, & Parada-Sanchez, 2021).

Figura 2

Imagens representativas de produtos de amplificação por PCR do crescimento de colônias semelhantes a *Streptococcus mutans* em ágar Mitis-Salivarius (MSA).

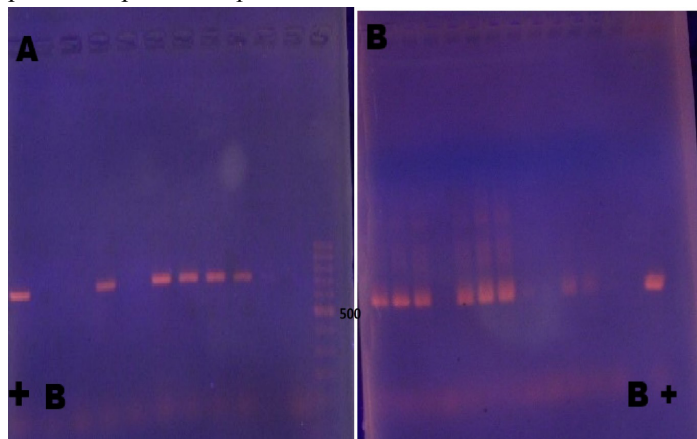


Fonte: Os autores.

Nota. A imagem da esquerda mostra o amplicon de 479 bp obtido com o conjunto de primers que visam o locus *htrA*, já a da direita mostra o amplicon de 114 bp gerado por primers específicos para o gene *gtfB*. Branco B, controle positivo +.

Figura 3

Imagens representativas de produtos de amplificação por PCR para sorotipos de *Streptococcus mutans*.



Fonte: Os autores.

Notas. O painel da esquerda corresponde ao sorotipo *c*, que produz um amplicon de 727 bp; o painel da direita corresponde ao sorotipo *e*, que produz um amplicon de 517 bp. B é o branco, + controle positivo.

CONCLUSÃO

Este estudo preliminar, conduzido por meio de uma amostra com estudantes de graduação em odontologia de origens maia e mestiça no sudeste do México, demonstra hábitos alimentares subótimos, caracterizados por um consumo elevado de açúcar. A PCR confirmou que metade das colônias semelhantes a *S. mutans* eram a bactéria, resultando em uma prevalência geral de 39%. A prevalência de cárie observada, de 54%, foi notavelmente menor do que a taxa de 83% relatada para a população geral. Além disso, nenhuma correlação perceptível foi estabelecida entre a presença de *S. mutans* e a ocorrência de cárie, provavelmente devido ao tamanho da amostra estudada.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram a ausência de conflito de interesse.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Os autores declaram a ausência de fontes de financiamento.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Conceitualização: F. L. P., V. M. Curadoria de dados: J. C. C. Análise de dados: V. M. Pesquisa: F. L. P., S. V. E. Metodologia: S. V. E., V. M. Administração do projeto: V. M. Disponibilização de ferramentas: J. C. C. Supervisão: V. M. Validação de dados e de experimentos: J. C. C., V. M. Redação do rascunho inicial: F. L. P. Revisão e edição da escrita: J. C. C.

REVISÃO POR PARES

A Revista Uningá agradece à Profa. Dra. Maria Cristina Teixeira Cangussu e ao revisor anônimo pelas valiosas contribuições prestadas durante o processo de revisão por pares deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Abranches, J., Miller, J. H., Martinez, A. R., Simpson-Haidaris, P. J., Burne, R. A., & Lemos, J. A. (2011). The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infection and Immunity*, 79(6), pp. 2277-2284. doi: 10.1128/iai.00767-10
- Aguilar-Díaz, F. C., Ponce-Cruz, Y. R., Mortellaro, C., Giacomello, M., Manfredi, B., Khijmatgar, S., ... Del Fabbro, M. (2021). Knowledge, practices and perceptions regarding oral health preventive measures among Mexican dental students: A cross-sectional survey study. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 35(2 Suppl. 1), pp. 163-171. doi: 10.23812/21-2suppl-16
- Angelis, M. T., Pasquantonio, G., Cerroni, L., Petrelli, D., Lauro, D., Longhi, M., ... Vitali, L. A. (2016). Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Streptococcus mutans* isolated from diabetic patients in Rome, Italy. *SpringerPlus*, 5(1), 1794. doi: 10.1186/s40064-016-3470-0
- Ballón-Salcedo, C. E., Cacya-Apaza, I. L., & Valdivia-Silva, J. (2019). Inmunidad de la mucosa oral: nuevas tendencias en investigación. *Dermatología Peruana*, 29(1), pp. 22-30
- Barquera, R., Zunuga, J., Flores-Rivera, J., Corona, T., Penman, B., Hernández-Zaragoza, D., ... Yunis, D. (2020). Diversity of HLA Class I and Class II blocks and conserved extended haplotypes in Lacandon Mayans. *Scientific Reports*, 10(3248). doi: 10.1038/s41598-020-58897-5
- Bedoya-Correa, C. M., Rincón-Rodríguez, R. J., & Parada-Sanchez, M. T. (2021). Acidogenic and aciduric properties of *Streptococcus mutans* serotype c according to its genomic variability. *European Journal of Oral Sciences*, 129(6), pp. e12824. doi: 10.1111/eos.12824
- Beighton, D. (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33(4), pp. 248-255. doi: 10.1111/j.1600-0528.2005.00232.x
- Carletto-Körber, F. P., González-Ittig, R. E., Jimenez, M. G., & Cornejo, L. S. (2015). Serotype diversity of *Streptococcus mutans* and caries activity in children in Argentina. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 16(3), pp. 177-180. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26418917>
- Chen, Z., Saxena, D., Caufield, P. W., Ge, Y., Wang, M., & Li, Y. (2007). Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiology Letters*, 272(2), pp. 154-162. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00756.x
- Duque-de-Estrada-Riverón, J., Pérez-Quiñonez, J., & Hidalgo-Gato-Fuentes, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología*, 43(1), pp. 47-55. Recuperado de <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2475>

- Elm, E., Altman, D. G., Egger, M., Pocock, S. J., Gøtzsche, P. C., & Vandenbroucke, J. P. (2007). The strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Annals of Internal Medicine*, 147(8), pp. 573-577. doi: 10.7326/0003-4819-147-8-200710160-00010
- Elyassi, M., Babaeekhou, L., & Ghane, M. (2022). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* contributions in dental caries in Iranian and Afghan children: A report from serotype distribution and novel STs. *Archives of Oral Biology*, 139, pp. 105431. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105431
- García-Cortés, J. O., Mejía-Cruz, J. A., Medina-Cerda, E., Orozco-De la Torre, G., Medina-Solís, C. E., Márquez-Rodríguez, S. ... Islas-Granillo, H. (2014). Experiencia, prevalencia, severidad, necesidades de tratamiento para caries dental e índice de cuidados en adolescentes y adultos jóvenes mexicanos. *Revista de Investigación Clínica*, 66(6), pp. 505-511. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=57287>
- García-Silva, R., Hernández-Doño, S., Román-Amparo, J., Trujillo-Vizuet, G., Mena-Vela, B., Rizo-Pinto, A. ... Sepúlveda-Delgado, J. (2021). Mayan alleles of the HLA-DRB1 major histocompatibility complex might contribute to the genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Mexican patients from Tapachula, Chiapas. *Clinical Rheumatology*, 40(8), pp. 3095-3103. doi: 10.1007/s10067-021-05636-4
- Gobierno de la República de México. (2018). *Catálogo universal de servicios de salud de México 2018* [Online]. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/848162/RESULTADOSDELSIVEPAB2021.pdf>
- Gómez-García, A. P., López-Vidal, Y., Pinto-Cardoso, S., & Aguirre-García, M. M. (2022). Overexpression of proinflammatory cytokines in dental pulp tissue and distinct bacterial microbiota in carious teeth of Mexican Individuals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, pp. 958722. doi: 10.3389/fcimb.2022.958722
- INEGI. (2020). Panorama sociodemográfico de Campeche. Censo de Población y Vivienda 2020. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825197759.pdf
- Hernández-Doño, S., Sánchez-González, R. A., Trujillo-Vizuet, M. G., Zamudio-Castellanos, Y. F., García Silva, R., Bulos-Rodríguez, P. ... Sepúlveda-Delgado, J. (2022). Protective HLA alleles against severe COVID-19: HLA-A*68 as an ancestral protection allele in Tapachula-Chiapas, Mexico. *Clinical Immunology*, 238:108990. doi: 10.1016/j.clim.2022.108990
- Kawamura, M., Spadafora, A., Kim, K. J., & Komabayashi, T. (2002). Comparison of United States and Korean dental hygiene students using the Hiroshima university-dental behavioural inventory (HU-DBI). *International Dental Journal*, 52(3), pp. 156-162. doi: 10.1111/j.1875-595x.2002.tb00621.x
- Lara-Capi, C., Cagetti, M. G., Cocco, F., Lingström, P., García-Godoy, F., & Campus, G. (2018). Effect of body weight and behavioural factors on caries severity in Mexican rural and urban adolescents. *International Dental Journal*, 68(3), pp. 190-196. doi: 10.1111/idj.12351
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), pp. 353-380. doi: 10.1128/mr.50.4.353-380.1986
- Marsh, P. D. (2018). In sickness and in health-what does the oral microbiome mean to us? An ecological perspective. *Advances in Dental Research*, 29(1), pp. 60-65. doi: 10.1177/0022034517735295
- Mattos-Graner, R. O., Klein, M. I., & Smith, D. J. (2014). Lessons learned from clinical studies: Roles of Mutans Streptococci in the pathogenesis of dental caries. *Current Oral Health Reports*, 1(1), pp. 70-78. doi: 10.1007/s40496-013-0008-1
- Méndez, S., Román-Montero, J., De Miguel, A., Rojo, R., López, A. (2022). Effect of the 2008 economic crisis on oral health in Spain: analysis of serial cross-sectional, population-based health surveys. *BMJ Open*, 12(12), pp. e061947. doi: 10.1136/bmjopen-2022-061947
- Momeni, S. S., Ghazal, T., Grenett, H., Whiddon, J., Moser, S. A., & Childers, N. K. (2019). *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. *Molecular Oral Microbiology*, 34(2), pp. 64-73. doi: 10.1111/omi.12254
- Moreno-Estrada, A., Gignoux, C., Fernández-López, J., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A., ... Bustamante, C. (2014). The genetics of Mexico recapitulates native American substructure and affects biomedical traits. *Science*, 12; 344(6189), pp. 1280-1285. doi: 10.1126/science.1251688
- Nakano, K., & Ooshima, T. (2009). Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiology*, 4(7), pp. 891-902. doi: 10.2217/fmb.09.64
- Praveen, T., Kotrashetti, V. S., Nayak, R. S., Naik, S. S., Bhat, K., & Kugaji, M. S. (2024). Polymerase chain reaction-based identification of various serotypes of *Streptococcus mutans* in adults with and without dental caries. *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics*, 27(3), pp. 315-320. doi: 10.4103/jcde.jcde_312_23
- Rincón-Rodríguez, R. J., Parada-Sanchez, M. T., Bedoya-Correa, C. M., & Arboleda-Toro, D. (2019). Genetic diversity of *Streptococcus mutans* serotype c isolated from white spot and cavitated caries lesions from schoolchildren. *Archives of Oral Biology*, 100, pp. 33-41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.02.003
- Rosero, N. S., Prado, R. S., Guirao, A. A., & Santos, Y. (2020). Molecular and serological typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from young Galician population: relationship with the oral health status. *International Microbiology*, 23(4), pp. 589-596. doi: 10.1007/s10123-020-00132-2
- Ruffo, F., Toledo, L., Machado, T. (2022). Social economic disadvantage and untreated dental caries: findings from a cohort study in adolescents. *Caries Research*, 56(3), pp. 179-186. doi: 10.1159/000525238
- Shibata, Y., Ozaki, K., Seki, M., Kawato, T., Tanaka, H., Nakano, Y., & Yamashita, Y. (2003). Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), pp. 4107-4112. doi: 10.1128/jcm.41.9.4107-4112.2003
- Yoshida, A., Suzuki, N., Nakano, Y., Kawada, M., Oho, T., & Koga, T. (2003). Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), pp. 4438-4441. doi: 10.1128/jcm.41.9.4438-4441.2003
- Zeng, Y., Youssef, M., Wang, L., Alkhars, N., Thomas, M., Cacciato, R., ... Xiao, J. (2020). Identification of Non-*Streptococcus mutans* Bacteria from Pre-erupt Infant Saliva Grown on Mitis-Salivarius-Bacitracin Agar. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 44(1), pp. 28-34. doi: 10.17796/1053-4625-44.1.5