



Diagnóstico microbiológico y molecular de bacterias cariogénicas en mujeres embarazadas de la Región de La Araucanía, Chile

Christian L. Herrera G., Patricio Pantoja F., Tomás de La Maza De la M.,
Antonio Sanhueza C. y Luis A. Salazar N.

Universidad de La Frontera,
Temuco, Chile

Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias
Preclínicas (CLHG)

Estudiante de Odontología (PPF, TDLM)
Departamento de Ciencias Básicas
(LASN)

Facultad de Ingeniería, Ciencias y
Administración. Departamento de
Matemática y Estadística (ASC)

Financiamiento: Proyecto DIUFRO EP
120335, Dirección de Investigación y
Desarrollo, Universidad de La
Frontera y Programa "Aplicación
Sistema Financiamiento de Tesis Pro
Desarrollo IX Región-FNDR", año
2004, Código BIP 20167359-0.

Recibido: 25 de noviembre de 2006
Aceptado: 16 de abril de 2007

Correspondencia a:

Luis A. Salazar Navarrete
lsalazar@ufro.cl

Microbiologic and molecular diagnostic of cariogenic bacteria in pregnant women from the Araucania Region of Chile

Dental caries is a transmissible infectious disease in which *Streptococcus mutans* is a principal protagonist. Although it is widely believed that pregnancy is harmful to teeth, the effect of pregnancy on the development of caries is not clear. Considering this situation, the aim of the present study was to evaluate the levels of infection and to differentiate bacterial species with cariogenic potential in pregnant women from the Araucania region in Chile, by bacteriological and molecular analysis. In this work, we evaluated 51 pregnant women aged 15 to 40 years. The results show that 100% of women are infected by mutans streptococci Group, and 70.6% exhibited high levels of infection (> 500.000 cfu/mL). The molecular analysis shows that *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* frequencies were 92.1% and 1.9%, respectively. In conclusion, our data suggest that pregnant women are a high risk group for caries development.

Key words: Caries, *Streptococci mutans*, molecular diagnosis.

Palabras claves: Caries, *Streptococcus grupo mutans*, molecular diagnosis.

Introducción

En Chile, la situación de la salud dentaria es bastante estremecedora. Si bien, no existen estudios nacionales en relación a la caries dental en el adulto, el año 1995 se determinó que 100% de los adultos de nivel socioeconómico bajo y medio-bajo, residentes en la Región Metropolitana (RM) presentaban caries con índices COPD (Dientes Cariados, Obturados y Perdidos) superiores a 25 en individuos mayores de 35 años¹. En el año 1999, un estudio también realizado en la RM, comprobó que 98% de las mujeres embarazadas de nivel socioeconómico bajo presentaban caries² y la encuesta nacional de salud efectuada por el MINSAL durante el año 2003, señala que más de 70% de la población manifiesta tener su dentadura incompleta, a 90% de los individuos de nivel socioeconómico bajo le faltan piezas dentales y 66% de la población general tiene caries³.

En el caso de los niños, estudios realizados durante los años 1996 y 1999, mostraron la presencia de altos índices de caries, con una prevalencia nacional de caries dentales de 84% en escolares de 6 a 8 y 12 años. En la Región de la Araucanía, la situación es aún más

dramática, ya que la prevalencia de caries para los niños de 6 a 8 años es de 96,7% y para los de 12 años es de 97,8%, siendo ambas prevalencias las más altas del país⁴.

Estudios clínicos han demostrado que los tejidos orales pueden ser afectados por el embarazo. Si bien está ampliamente difundida la creencia que la gestación es perjudicial para la dentadura, los efectos del embarazo en la iniciación o progresión de las caries no son claros. Existen evidencias de que los dientes no se ablandan y que los niveles de calcio u otros minerales no disminuyen en forma significativa; es principalmente el ambiente del diente el que se ve afectado, al aumentar el número de microorganismos cariogénicos, coincidentemente, con la disminución del pH y de la actividad tampón de la saliva durante la gestación⁵. Es difícil estimar la relación entre el aumento de caries y embarazo; sin embargo, Banoczy y cols, encontraron que las mujeres con hijos tienen un COPD más alto que las mujeres sin hijos⁶.

Considerando la compleja realidad de la salud oral en Chile, específicamente la alta prevalencia de caries y la no existencia de antecedentes sobre esta patología en mujeres embarazadas de regiones distintas a la



RM, se hace necesario conocer cuál es la realidad de la salud dentaria de estas mujeres. Esto, no sólo considerando la trascendencia que tiene para ella misma, sino que, más importante aún, el hecho de que la calidad de la salud bucal de los niños, tiene relación con la salud bucal de sus madres; se ha demostrado que la principal fuente de adquisición y transmisión de las bacterias con potencial cariogénico en niños, es a partir de la saliva de sus propias madres^{7,8}.

Alrededor de 300 especies bacterianas han sido asociadas con la placa dental, pero sólo la presencia de *Streptococcus* del grupo mutans ha sido relacionada con la formación de caries dental en humanos, considerándose como el principal agente productor de caries, y dentro de este grupo, *Streptococcus mutans* (*Streptococcus* grupo mutans especie *mutans*) y *Streptococcus sobrinus* (*Streptococcus* grupo mutans especie *sobrinus*) son los que aparecen con mayor frecuencia^{9,10}.

En la actualidad, los métodos de detección e identificación fenotípica de bacterias cariogénicas y, específicamente, de *Streptococcus* grupo mutans, utilizan pruebas como: manitol, resistencia a bacitracina, arginina dehidrolasa, inulina, esculina y rafinosa, entre otros, lo que los hace bastante laboriosos y extensos¹¹. Como consecuencia de esto, se han comenzado a aplicar técnicas de biología molecular basadas en la reacción de polimerasa en cadena (RPC), técnica que permite obtener resultados altamente sensibles y específicos, con rapidez y de forma relativamente sencilla¹²⁻¹⁴.

La técnica de RPC tiene por finalidad amplificar segmentos específicos del ADN de una célula, lo que permite su detección e identificación. En el caso de *Streptococcus* del grupo mutans se han utilizado variados genes específicos para las diferentes especies pertenecientes a este grupo; algunos ejemplos son: *gtfB*, *groESL*, *wapA* y *spa*^{12,15-17}.

Por lo señalado anteriormente, esta investigación busca dar a conocer el grado y la frecuencia de infección por bacterias responsables de la producción de caries en mujeres embarazadas, grupo de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, mediante análisis microbiológico y molecular, en una de las regiones de Chile donde la prevalencia de caries es más elevada.

Material y Método

Pacientes y muestras clínicas: Se estudiaron 51 mujeres embarazadas, de nivel socioeconómico bajo, edades entre 15 y 40 años, con un promedio de edad de 27 ± 8 años, y una edad gestacional de 14 ± 8 semanas, de las cuales 17 tenían ascendencia mapuche¹.*

El promedio de edad de este grupo fue de 25 ± 8 años, y la edad gestacional de 18 ± 8 semanas. Todas las pacientes provenían del Consultorio de Atención Secundaria Miraflores de la ciudad de Temuco (capital de la Región de La Araucanía, Chile).

Criterios de exclusión: Se excluyeron las mujeres que estuvieran haciendo uso de terapia antimicrobiana, tanto al momento del estudio como dos meses previos a éste; que se encontraran en tratamiento con algún otro medicamento; las que presentaban signos clínicos de xerostomía o la presencia de enfermedades metabólicas, como diabetes mellitus o diabetes gestacional.

El estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera. Todas las participantes firmaron voluntariamente un consentimiento informado.

Análisis clínico: Las condiciones de sus dentaduras fueron evaluadas mediante un examen clínico oral, en el que se obtuvo el índice COPD, por medio de una ficha clínica que tuvo la función de contener la información general del paciente: datos personales, antecedentes mórbidos y médicos, junto con los antecedentes odontológicos personales. Además, contiene un detalle del examen intraoral realizado y el índice COPD arrojado.

Análisis microbiológico: La detección de los microorganismos cariogénicos fue realizada mediante el método descrito por Linossier y cols¹⁸. De acuerdo con el resultado de los recuentos, las pacientes se clasificaron dentro de tres rangos de riesgo cariogénico: *bajo*, *medio* y *alto*.

Análisis molecular: Para la detección e identificación de las bacterias *S. mutans* y *S. sobrinus* se amplificó un fragmento específico del ADN cromosomal de estas bacterias, mediante la técnica de RPC, utilizando como templado saliva. Las secuencias de los partidores usados, el tamaño de los fragmentos amplificados, la posición en el gen y T° de hibridación son descritos en la Tabla 1.

Para evaluar los productos de la RPC, estos se tiñeron con bromuro de etidio y se realizó electroforesis en gel de agarosa, visualizando los productos de la RPC en un transiluminador UV.

Análisis estadístico: Los resultados fueron analizados mediante el programa estadístico SigmaStat para

*Definido por el criterio de dos apellidos mapuches y el reconocimiento por la paciente de su pertenencia a la etnia señalada.



Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados para la detección e identificación de *S. mutans* y *S. sobrinus* en muestras de saliva por RPC

Partidores	Secuencia	Localización cADN	T° hibridación	Fragmento (pb)
SMUT5	5'-tgaaaccttgctctctctctttacc-3'	1.760 - 1.783	53	137
SMUT3	5'-tcagtttccaagggtctctg-3'	1.877 - 1.896		
SSOB5	5'-gcagtctgacgatgctcttac-3'	184 - 204	50	198
SSOB3	5'-ccgtcagtcacaacaataatc-3'	361 - 381		

La secuencia de nucleótidos fue obtenida desde el GenBank, Número de acceso AE014854.1 para *Streptococcus mutans* y NAB083137.1 para *Streptococcus sobrinus*.

Tabla 2. Grupos de riesgo clasificados de acuerdo al recuento de ufc/mL de *Streptococcus* del grupo mutans, obtenido por método semicuantitativo (LinSCREEN®)

ufc/mL	Riesgo	n	%
10.000-50.000	Bajo	9	17,6
100.000-250.000	Medio	6	11,8
500.000-1.000.000	Alto	36	70,6
Total		51	100

n, número de individuos

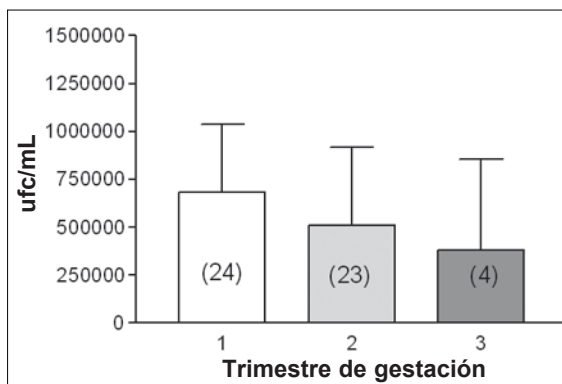


Figura 1. Recuentos de *Streptococcus* grupo mutans (ufc/mL) en el grupo de mujeres embarazadas, según trimestre de gestación. Número de muestras entre paréntesis.

Tabla 3. Comparación de los niveles de riesgo cariogénico en relación al trimestre de gestación

Riesgo	Bajo		Medio		Alto	
	n	%	n	%	n	%
Trimestre 1	2	8,3	2	8,3	20	83,3
Trimestre 2	5	21,7	4	17,4	14	60,9
Trimestre 3	2	50,0	0	0	2	50,0

n, número de individuos

Windows, versión 2.0 (San Rafael, CA, EE.UU.). Las variables continuas fueron evaluadas en forma descriptiva. Se procedió al cálculo de promedios, desviaciones estándar y la observación de valores máximos y mínimos. La asociación entre las diferentes variables fue evaluada mediante los tests t de Student o ANOVA. El nivel de significancia utilizado fue $p < 0,05$.

Resultados

El análisis clínico mostró que las pacientes estudiadas tenían un COPD de $10,2 \pm 4,7$, lo que indica una historia de caries cercana al 30% de la dentadura. Además, 100% de las mujeres embarazadas presentaba gingivitis.

Los resultados de los recuentos microbiológicos para *S. grupo mutans* muestran que la totalidad de las mujeres estudiadas presentan estas bacterias en su cavidad oral (> 10.000 ufc/mL). En la Tabla 2 se presenta la clasificación del riesgo de acuerdo al recuento de colonias de *S. grupo mutans* en saliva.

Al evaluar el grupo de mujeres según trimestre de gestación y relacionarlo con los recuentos de colonias, llama la atención que las mujeres que se encontraban en el primer trimestre de embarazo presentaron valores de ufc/mL mayores que aquellas que se encontraban en el segundo y tercer trimestre de gestación. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p = 0,184$, Figura 1).

Al analizar los resultados de la clasificación de riesgo según trimestre de gestación, 83,3% de las mujeres que se encontraban en el primer trimestre (< 12 semanas) presentaron un nivel de riesgo alto, a diferencia de las mujeres que se encontraban en el segundo y tercer trimestre, en las que se observó 60,9 y 50%, respectivamente (Tabla 3). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p = 0,185$).

Adicionalmente, al comparar los recuentos de *S. grupo mutans* según etnia, se observó similitud en el recuento promedio de colonias entre mujeres de ascendencia Mapuche y no Mapuche. Además, al comparar los índices COPD de ambos grupos, éstos también se mostraron similares, y no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

El resultado de la detección e identificación de *Streptococcus* cariogénicos por técnica de RPC se puede observar en la Figura 2, donde se muestran los productos de amplificación que indican la presencia de *S. mutans* (137 pb) y *S. sobrinus* (198 pb).

La frecuencia de *S. mutans* en el grupo de estudio fue de 92,1% (47/51) y de *S. sobrinus* fue de 1,9% (1/51). La presencia de ambas bacterias en conjunto, fue detectada en 1,9% de las muestras (1/51).



Tabla 4. Comparación de los recuentos de colonias (media ± DS), clasificación del riesgo e índice COPD entre mujeres embarazadas de origen mapuche y no mapuche

	n	Recuento ufc/mL*	Nivel de riesgo (%)			COPD**
			Bajo	Medio	Alto	
Mapuches	17	572.353 ± 446.955	29,4	5,9	64,7	12,1 ± 4,9
No mapuches	34	583.529 ± 372.468	11,8	14,7	73,5	9,3 ± 4,3

COPD: dientes cariados, obturados y perdidos
n, número de individuos. * p=0,925; **p=0,048

Las muestras negativas (4/51) para la técnica de RPC y que presentaban un recuento positivo, podrían explicarse porque existen otras especies dentro del grupo mutans que no son posibles de detectar con los partidores usados, ya que estos tienen una alta especificidad.

Discusión

Desde varias décadas, la caries dental ha sido reconocida como una enfermedad infecto-contagiosa originada por un grupo de bacterias conocidas como *Streptococcus* grupo mutans¹⁹.

La infancia temprana puede ser el período más importante para la salud dental futura, ya que mientras antes se produzca la infección por *Streptococcus* del grupo mutans, mayor es el riesgo de desarrollar caries²⁰. Es aquí donde cobra mayor importancia el estudio de la microbiota oral en la mujer gestante, ya que los cambios en el embarazo pueden predisponer al desarrollo de caries al aumentar los recuentos de bacterias cariogénicas y aumentar el riesgo de infección de sus hijos, con el consecuente riesgo de éstos para desarrollar caries⁵.

El análisis clínico mostró un índice COPD de 10,2 ± 4,7. En Chile, sólo existe una publicación anterior en relación a recuentos de *Streptococcus* grupo mutans en mujeres embarazadas², donde se observó un índice COPD de 15,8 ± 5,4; resultado similar al obtenido en un estudio realizado en la ciudad de Bauru (Brasil)²¹, que encontró un índice COPD de 14.

La prevalencia de *Streptococcus* grupo mutans en nuestro grupo de estudio fue de 100%, lo que es concordante con lo encontrado en la literatura médica^{2,21}. Es importante señalar que 70,6% del grupo en estudio presentó recuentos superiores a 500.000 ufc/mL, lo que indica un alto riesgo para el desarrollo de caries, de acuerdo con el método microbiológico utilizado.

Los recuentos de *S.* grupo mutans no tuvieron dife-

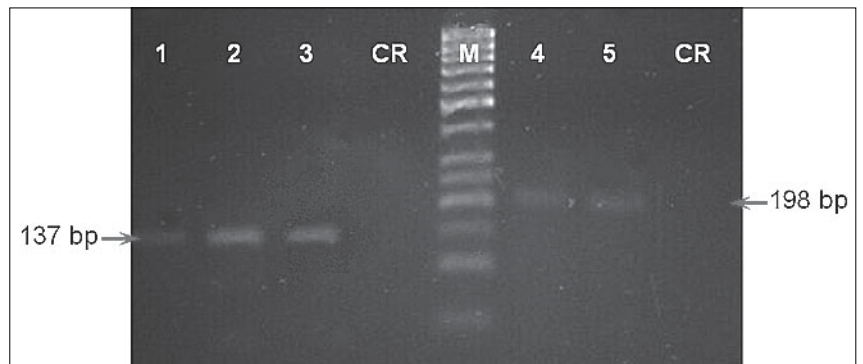


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, que muestra los fragmentos indicadores de la presencia de *Streptococcus mutans* (carriles 1, 2 y 3) y *Streptococcus sobrinus* (carriles 4 y 5). M, marcador de tamaño molecular de ADN (50 pb) y CR, control de reactivos.

rencia significativa de acuerdo con el trimestre de embarazo. Resultado similar al obtenido por Villagrán y cols.², en un estudio realizado en 174 mujeres embarazadas de la RM.

Los resultados del análisis molecular, indican que la presencia de la especie *S. mutans* es la de mayor frecuencia, lo que concuerda con lo observado por otros autores²²⁻²⁵. Por otro lado, *S. sobrinus* se encuentra en una proporción muy inferior. Respecto del análisis de esta especie bacteriana, existen diferencias notables entre las frecuencias encontradas por diversos autores^{12, 22-25}. Sólo una de las pacientes presentó asociación entre *S. mutans* / *S. sobrinus*, hecho muy relevante, ya que está demostrado que esta asociación se presenta en individuos con índices de caries superiores a los que presentan sólo *S. mutans*²⁶.

La existencia de muestras negativas mediante la técnica de RPC, puede deberse a que existen otras especies del grupo *Streptococcus* mutans tales como, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus*, *S. downei* y *S. macacae*, que no pueden ser identificadas con los partidores utilizados, lo que confirma la alta especificidad de la técnica de RPC.

Al clasificar el grupo en estudio, en mapuches y no



mapuches, no se observaron diferencias significativas en los parámetros estudiados (COPD, recuento bacteriológico y análisis molecular).

Este estudio destaca la importancia del control odontológico pre y post-natal, tanto desde el punto de vista de la prevención como del tratamiento, ya que está comprobado que estas actividades en la mujer embarazada tienen importantes efectos, reduciendo los niveles de *S. grupo mutans* y de caries en forma significativa tanto en ella como en su descendencia²⁷⁻³⁰.

Es importante destacar también, que la técnica de RPC es utilizada por primera vez en nuestro país para la identificación de bacterias cariogénicas en mujeres embarazadas y que, por su rapidez, alta especificidad y sensibilidad, es una alternativa válida, tanto al momento de desarrollar estudios epidemiológicos como para la evaluación y diagnóstico de pacientes. Si bien esta técnica permite la identificación, y no la cuantificación de el o los agentes etiológicos, su aplicación puede ser de gran importancia al momento de seleccionar un esquema de tratamiento, debido a que no todas las especies del grupo mutans poseen el mismo potencial cariogénico.

Conclusiones

Las mujeres embarazadas estudiadas se encuentran con un alto riesgo de desarrollar caries ya que, la totalidad de ellas, se encuentran infectadas por *Streptococcus* grupo mutans y tres cuartas partes del grupo estudiado presentan un elevado riesgo

cariogénico, desde el punto de vista microbiológico. Estos antecedentes indican que es necesario tomar medidas tendientes a mejorar la salud bucal de las mujeres durante la gestación, con el objetivo de prevenir el desarrollo de caries en ellas y la transmisión temprana de bacterias cariogénicas a sus hijos.

Resumen

La caries dental es una enfermedad infecciosa, en la cual *Streptococcus* del grupo mutans, son los principales protagonistas. Aunque está ampliamente difundida la creencia de que el embarazo es perjudicial para la salud dental, el real efecto de esta condición sobre el desarrollo de caries aún no está claro. Considerando esta situación, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar los niveles de infección en mujeres embarazadas de la Región de La Araucanía (Chile) y diferenciar especies bacterianas con potencial cariogénico, de aquellas sin este potencial, mediante análisis bacteriológico y molecular. En el presente estudio fueron evaluadas 51 mujeres gestantes con edades que fluctuaron entre 15 y 40 años. Los resultados muestran que 100% de las mujeres se encuentran infectadas por *Streptococcus* del grupo mutans, de las cuales 70,6% muestra un riesgo elevado de desarrollar caries (>500.000 ufc/ml). El análisis molecular mostró que las frecuencias de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* fueron 92,1% y 1,9%, respectivamente. En conclusión, nuestros datos sugieren que las mujeres embarazadas son un grupo de alto riesgo para el desarrollo de caries dental.

Referencias

- 1.- Gamonal J A, López N J, Aranda W. Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile. *Int Dent J* 1998; 48: 96-103.
- 2.- Villagrán E, Linossier A, Donoso E. Count of salivary Streptococci mutans in pregnant women of the metropolitan region of Chile: cross-sectional study. *Rev Méd Chile* 1999; 127: 165-70.
- 3.- MINSAL. Encuesta Nacional de Salud 2003. Santiago. Marzo 2004.
- 4.- Urbina T, Caro J P, Vicent M. Caries y fluorosis en niños de 6 a 8 años y 12 años Minsal, Chile. Departamento de Estadísticas e Información. 1996-1999.
- 5.- Laine M A. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand* 2002; 60: 257-64.
- 6.- Banoczy J, Orosz M, Gabris K, Nyarasy I, Rigo O, Schuder L. Investigation on the correlation of pregnancy, caries and gingivitis (author's transl). *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 1978; 66: 573-81.
- 7.- Lindquist B, Emilson C G. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res* 2004; 38: 95-103.
- 8.- Mattos-Graner R O, Li Y, Caufield P W, Duncan M, Smith D J. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2313-6.
- 9.- Ajdic D, McShan W M, McLaughlin R E, Savic G, Chang J, Carson M B, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 14434-9.
- 10.- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50: 353-80.
- 11.- Liébana J. Microbiología Oral. 2ª Edición 2002, McGraw-Hill Interamericana de España: Cap. 11 y 32.
- 12.- Igarashi T, Yamamoto A, Goto N. PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J Med Microbiol* 2000; 49: 1069-74.
- 13.- Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217: 23-30.
- 14.- Aguilera L, Estrada I. Detección de una secuencia del gene *spaP* de *Streptococcus*



- mutans* en muestras de placa dental mediante reacción en cadena de la polimerasa. Revista ADM 2003; LX (5): 180-4.
- 15.- Nascimento M M, Hofling J F, Goncalves R B. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. Caries Res 2004; 38: 454-63.
- 16.- Hung W C, Tsai J C, Hsueh P R, Chia J S, Teng L J. Species identification of mutans streptococci by *groESL* gene sequence. J Med Microbiol 2005; 54: 857-62.
- 17.- Zhu L, Kreth J, Cross S E, Gimzewsky J K, Shi W, Oi F. Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. Microbiology 2006; 152: 2395-2404.
- 18.- Linossier A, Vargas A, Zillmann G, Arriagada M, Rojas R, Villegas R. *Streptococci mutans*: a semi-quantitative method to assess the risk to oral infection in preschool Chilean children. Rev Méd Chile 2003; 131: 412-18.
- 19.- Balakrishnan M, Simmonds R S, Tagg J R. Dental caries is a preventable infectious disease. Aust Dent J 2000; 45: 235-45.
- 20.- Mattos-Graner R O, Correa M S, Latorre M R, Peres R C, Mayer M P. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. J Public Health Dent 2001; 61: 161-7.
- 21.- Torres S A, Rosa O, Akiyoshi N, Silveira A, Bretz W. Níveis de infecção de estreptococos do grupo mutans em gestantes. Rev Odontol Univ Sao Paulo. 1999; 13: 225-31.
- 22.- Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 195-9.
- 23.- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 258-62.
- 24.- Sato T, Matsuyama J, Kumagai T, Mayanagi G, Yamaura M, Washio J, *et al*. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. Lett Appl Microbiol 2003; 37: 66-9.
- 25.- Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbiol 2002; 51: 443-7.
- 26.- Hofling J F, Spolidorio D M, Pereira C V, Rosa E A R, Moreira D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev Odontol Univ São Paulo 1999; 13: 173-80.
- 27.- Gunay H, Dmoch-Bockhorn K, Gunay Y, Geursen W. Effect on caries experience of a long-term preventive program for mothers and children starting during pregnancy. Clin Oral Investig 1998; 2: 137-42.
- 28.- Zanata R L, Navarro M F, Pereira J C, Franco E B, Lauris J R, Barbosa S H. Effect of caries preventive measures directed to expectant mothers on caries experience in their children. Braz Dent J 2003; 14: 75-81.
- 29.- Gómez S S, Weber A A, Emilson C G. A prospective study of a caries prevention program in pregnant women and their children five and six years of age. ASDC J Dent Child 2001; 68: 191-5, 152.
- 30.- Brambilla E, Felloni A, Gagliani M, Malerba A, García-Godoy F, Strohmenger L. Caries prevention during pregnancy: results of a 30-month study. J Am Dent Assoc 1998; 129: 871-7.