

Efeito da Penicilina G a cada Três Semanas sobre o Surgimento de *Streptococcus Viridans* Resistentes à Penicilina na Microflora Oral

Effect of Penicillin G Every Three Weeks on Oral Microflora by Penicillin Resistant *Viridans Streptococci*

André Andrade de Aguiar^{1,2}, Roney Orismar Sampaio^{1,2}, Jorge Luiz de Mello Sampaio³, Guilherme Sobreira Spina^{1,2}, Ricardo Simões Neves^{1,4}, Luiz Felipe Pinho Moreira^{1,5}, Max Grinberg^{1,2}

Universidade de São Paulo¹; Departamento de Doença Valvular – Instituto do Coração (InCor)²; Fleury Medicina Diagnóstica³; Departamento de Odontologia – Instituto do Coração (InCor)⁴; Departamento de Cirurgia Torácica – Instituto do Coração (InCor)⁵, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Penicilina G benzatina a cada 3 semanas é o protocolo padrão para a profilaxia secundária para febre reumática recorrente.

Objetivo: Avaliar o efeito da penicilina G benzatina em *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* sobre os pacientes com doença valvular cardíaca, devido à febre reumática com recebimento de profilaxia secundária.

Métodos: Os estreptococos *Viridans* bucais foram avaliados antes (momento basal) e 7 dias (7º dia) após a profilaxia secundária da febre reumática com a penicilina G benzatina em 100 pacientes. Amostras de saliva foram avaliadas para verificar a contagem de colônias e presença de *S. sanguinis* e *S. oralis*. Amostras de saliva estimulada pela mastigação foram serialmente diluídas e semeadas em placas sobre agar-sangue de ovelhas seletivo e não seletivo a 5% contendo penicilina G. A identificação da espécie foi realizada com testes bioquímicos convencionais. Concentrações inibitórias mínimas foram determinadas com o Etest.

Resultados: Não foram encontradas diferenças estatísticas da presença de *S. sanguinis* comparando-se o momento basal e o 7º dia ($p = 0,62$). No entanto, o número existente de culturas positivas de *S. oralis* no 7º dia após a Penicilina G benzatina apresentou um aumento significativo em relação ao valor basal ($p = 0,04$). Não houve diferença estatística existente entre o momento basal e o 7º dia sobre o número de *S. sanguinis* ou *S. oralis* UFC/mL e concentrações inibitórias medianas.

Conclusão: O presente estudo mostrou que a Penicilina G benzatina a cada 3 semanas não alterou a colonização por *S. sanguinis*, mas aumentou a colonização de *S. oralis* no 7º dia de administração. Entretanto, a susceptibilidade do *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* à penicilina G não foi modificada durante a rotina de profilaxia secundária da febre reumática utilizando a penicilina G. (Arq Bras Cardiol 2012;98(5):452-458)

Palavras-chave: Penicilina G benzatina/uso terapêutico, febre reumática; doença valvar cardíaca, cavidade oral, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus oralis*.

Abstract

Background: Benzathine penicillin G every 3 weeks is the standard protocol for secondary prophylaxis for recurrent rheumatic fever.

Objective: Assess the effect of Benzathine penicillin G on *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus oralis* in patients with cardiac valvular disease due to rheumatic fever receiving secondary prophylaxis.

Methods: Oral streptococci were evaluated before (baseline) and 7 days (day 7) after Benzathine penicillin G in 100 patients receiving routine secondary rheumatic fever prophylaxis. Saliva samples were evaluated for colony count and presence of *S. sanguinis* and *S. oralis*. Chewing-stimulated saliva samples were serially diluted and plated onto both nonselective and selective 5% sheep blood agar containing penicillin G. The species were identified using conventional biochemical tests. Minimal inhibitory concentrations were determined with the Etest.

Results: No statistical differences were found in the presence of *S. sanguinis* comparing baseline and day 7 ($p = 0.62$). However, the existing number of positive cultures of *S. oralis* on day 7 after Benzathine penicillin G presented a significant increase compared to baseline ($p = 0.04$). No statistical difference was found between baseline and day 7 concerning the number of *S. sanguinis* or *S. oralis* CFU/mL and median minimal inhibitory concentrations.

Conclusion: This study showed that Benzathine penicillin G every 3 weeks did not change the colonization by *S. sanguinis*, but increased colonization of *S. oralis* on day 7 of administration. Therefore, susceptibility of *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus oralis* to penicillin G was not modified during the penicillin G routine secondary rheumatic fever prophylaxis. (Arq Bras Cardiol 2012;98(5):452-458)

Keywords: Penicillin G benzathine/therapeutic use; rheumatic fever; heart valve diseases; mouth; *Viridans Streptococcus*; *Streptococcus Oralis*.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: André Andrade de Aguiar •

Rua Botucatu, 572 - conjunto 31 - Vila Clementino - 04023-061 - São Paulo, SP - Brasil

E-mail: drandreaaguiar@yahoo.com.br

Artigo recebido em 05/07/11; revisado recebido em 18/07/11; aceito em 01/12/11.

Introdução

A febre reumática (FR) é a principal causa de doença cardíaca valvular nos países em desenvolvimento. A FR causa morbidade e mortalidade significativas, levando a 90% de cirurgias cardíacas em crianças e mais de 30% de cirurgias cardíacas em adultos. A profilaxia secundária com Penicilina G benzatina 1.200.000 U (PGB) a cada 3 semanas é o regime padrão para a prevenção da febre reumática recorrente em países em desenvolvimento. Sequelas valvares são as consequências mais terríveis da febre reumática aguda, e tais lesões cardíacas também podem predispor o paciente à endocardite infecciosa (EI), uma doença mórbida que agrava o prognóstico desses pacientes¹⁻⁴.

Apesar da profilaxia secundária amplamente recomendada para a FR com PGB a cada 3 semanas^{2,5,6}, poucos estudos avaliaram a susceptibilidade a antibióticos e a frequência de *Streptococcus Viridans* na flora oral de pacientes que receberam profilaxia secundária após FR com PGB. Além disso, nenhum dos estudos avaliou esta questão relacionada a *S. sanguinis* e *S. oralis*, que são espécies predominantes isoladas na EI^{7,8}.

A profilaxia com a PGB protege os pacientes da doença cardíaca valvular de novas recorrências de FR. Contudo, nenhum estudo avaliou a flora oral com uma casuística expressiva e com especificidade suficiente para esses patógenos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se existe uma associação entre a profilaxia com PGB e a colonização da cavidade oral com *Streptococcus Viridans* resistente à penicilina.

Métodos

Coorte

Cem pacientes foram selecionados e avaliados em dois períodos:

Momento basal com PGB e 7º dia pós PGB — Cem pacientes com FR sob regime de profilaxia secundária com penicilina G benzatina 1.200.000 UI por pelo menos seis meses antes da admissão no estudo. Pacientes com atividade reumática ou pacientes com diagnóstico de infecção foram excluídos.

Todos os pacientes foram avaliados clinicamente, tendo sido submetidos a inspeção da cavidade oral para evitar a admissão de pacientes com infecção sistêmica ou oral aguda.

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional e todos os pacientes do estudo deram seu consentimento informado.

Coleta de amostras, transporte e cultura

As amostras foram coletadas no início do estudo (100 amostras) e no 7º dia (100 amostras) após uma dose profilática de PGB. Amostras de saliva foram obtidas de pacientes que mascaravam pastilhas de parafina⁹ e foram coletadas em um frasco de plástico descartável esterilizado. Aproximadamente 1 mL foi transferido para um frasco contendo 5,7 mL de meio de viabilidade Göteborg, anaerobicamente preparado e esterilizado (VMGA II S)¹⁰. As amostras contidas no meio de transporte foram mantidas de 2°C a 8°C antes do plaqueamento. Amostras de saliva foram serialmente diluídas dez vezes em solução tampão fosfato com pH 7,2 antes do plaqueamento em ácido nalidíxico

numa base de agar de Columbia além de sangue de ovelha a 5% (CNASB), CNASB mais penicilina G (0,25 µg/mL)¹¹, e anfotericina B (0,5 µg/mL)¹²⁻¹⁵. Os meios foram incubados a 35°C a 5% de CO₂ por 72 horas e depois analisados para contagem de colônias para cada morfotipo colonial.

Identificação das espécies

Cada morfotipo colonial foi subcultivado em agar de soja tríptica além de sangue de ovelha a 5% (SBA) e testado para catalase e coloração de Gram. Cocos Gram-positivos e negativos para catalase foram posteriormente avaliados para verificação das seguintes características/utilização de substratos: hemólise, arginina, ureia, L-pirrolidonil-β naftilamida e hidrólise da esculina, β-N-acetil-glicosidase, α-D-glicosidase, β-N-acetil-galactosidase, susceptibilidade a optoquina, teste Voges-Proskauer e produção de ácido a partir da insulina, manitol, rafinose e melibiose como recomendado¹⁶.

Teste de susceptibilidade

A concentração inibitória mínima (CIM) para penicilina G foi determinada utilizando o Etest como recomendado pelo fabricante (AB Biodisk, Solna, Suécia). Os resultados foram interpretados como recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹¹.

Análise estatística

O modelo de regressão logística foi utilizado para verificar associação do grupo com a ocorrência de *S. sanguinis* e *S. oralis* com correções de idade e sexo.

A análise qualitativa foi realizada com o uso do teste não paramétrico de Mc Nemar.

A análise quantitativa foi realizada com o uso do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Aplicou-se uma significância estatística de 5% para todos os testes.

Resultados

O grupo estudado era composto por 100 pacientes, 38 homens, com idades entre 10 e 53 anos (26,5 ± 8 anos).

No grupo, 54 pacientes apresentavam insuficiência mitral, 27 apresentavam insuficiência aórtica, 25 tinham estenose mitral e 14 tinham estenose aórtica. Oito pacientes tinham prótese mitral biológica, 3 tinham prótese biológica aórtica, 2 tinham prótese mecânica mitral e 1 tinha prótese mecânica aórtica.

Não houve diferenças comparando-se o número de culturas positivas para *S. sanguinis* no momento basal e no 7º dia após a administração de PGB (p = 0,62, Tabela 1). No entanto, o número de culturas positivas para *S. oralis* no 7º dia após a administração de PGB apresentou um aumento significativo em relação ao valor basal (p = 0,04, Tabela 1).

As avaliações do número de UFC/mL na saliva dos pacientes no momento basal e no 7º dia após a administração de PGB foram subdivididas em *S. sanguinis* e *S. oralis*.

Os valores de UFC/mL referentes ao *S. sanguinis* e *S. oralis* na saliva não apresentaram diferenças entre o momento basal e o 7º dia após a administração de PGB (p = 0,68 e p = 0,80, respectivamente; Figura 1).

Tabela 1 - Culturas positivas para *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*

Grupos	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
Momento basal*	11	87
7º dia†	9	95‡

*Pacientes antes da administração da penicilina G benzatina; † Pacientes sob o efeito do 7º dia de administração da penicilina G benzatina; ‡p = 0,04.

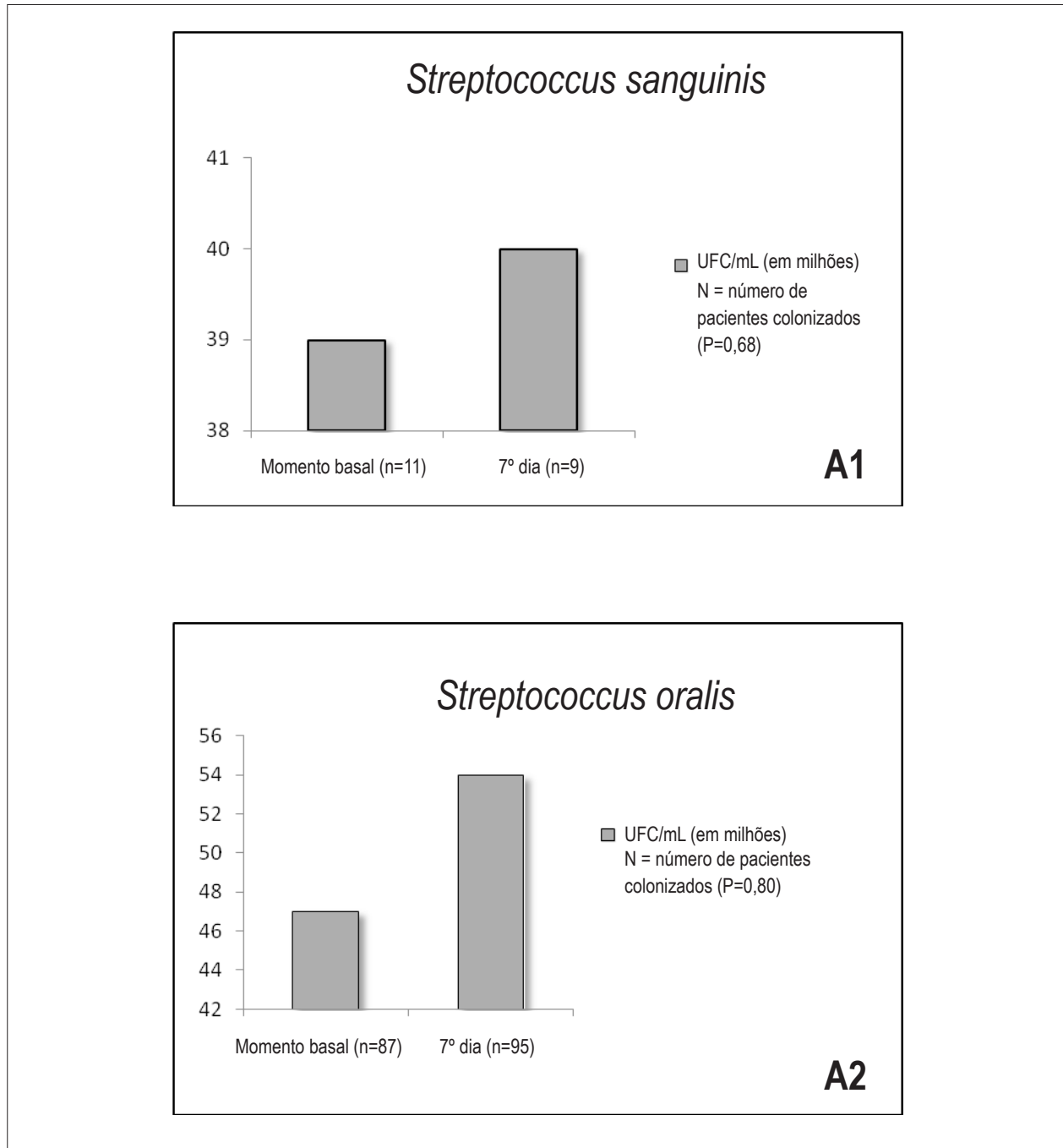


Fig. 1 – A1 — Distribuição de valores UFC/mL na saliva de pacientes colonizados por *S. sanguinis*; A2 — Distribuição de valores UFC/mL na saliva de pacientes colonizados por *S. oralis*.

As concentrações inibitórias mínimas para penicilina G foram subdivididas em *S. sanguinis* e *S. oralis*. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre o momento basal e o 7º dia após a administração de PGB sobre a CIM de *S. sanguinis* e *S. oralis* ($p = \text{NS}$; Figura 2).

A Tabela 2 mostra dados como CIM₅₀ e CIM₉₀, que representa as concentrações inibitórias mínimas para penicilina G para inibir 50% e 90%, respectivamente, do *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* suscetíveis à penicilina G.

Discussão

Este grupo de pacientes com doença cardíaca valvular está predisposto a endocardite infecciosa. Os resultados de endocardite infecciosa a partir da bacteremia muitas vezes estiveram relacionados com focos orais infecciosos. *Streptococcus Viridans* constituem o grupo predominante recuperados na EI, particularmente *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis*. O efeito da PGB crônica ainda não foi estudado com a especificidade relacionada a esses patógenos.

O estudo de coorte apresentou prevalência do sexo feminino (62/100), possivelmente devido à maior ocorrência geral de FR em mulheres¹⁷. Apesar da heterogeneidade de gênero, isto não representa um viés, pois não se observou diferença estatística ($p = \text{NS}$) entre a ocorrência de *S. sanguinis* e *S. oralis* em relação à idade e ao sexo dos pacientes quando foi aplicado o modelo de regressão logística. Além disso, não houve diferença estatística entre a taxa de cáries dentárias, perda de dentes, ou dentes com restaurações entre os sexos na população do estudo¹⁸. Todos os pacientes tiveram suas cavidades orais inspecionadas de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde¹⁹ para excluir a presença de infecções orais, que poderiam afetar a microbiota oral^{16,20-22}.

S. sanguinis e *S. oralis* são comensais comuns da cavidade oral presentes na formação inicial de placa bacteriana dentária, o que representa quase 80% de *Streptococcus* nesta fase²⁰⁻²³. A dose de PGB de 1.200.000 UI IM atua como um bactericida sobre o *Streptococcus*, sensível na fase de multiplicação ativa, o que, hipoteticamente, poderia causar uma diminuição desses microrganismos na cavidade bucal neste grupo de pacientes.

O *S. sanguinis* também foi observado em ambos os períodos, em um número limitado de pacientes, de forma semelhante ao observado por Bilavsky e cols.⁷. Não houve diferença ($p = 0,62$) de sua presença nos grupos estudados. Isso mostrou que a PGB não interferiu no crescimento das espécies. No entanto, outros estudos relataram um maior número de amostras de *S. sanguinis*^{20,21}, talvez devido ao uso da metodologia clássica para a identificação de *Streptococcus* (com o uso de kits de identificação disponíveis comercialmente em conjunto com testes de triagem padrão para o gênero). No entanto, no presente estudo, a metodologia descrita por Ruoff e cols.¹⁶ foi adotada, realizando-se testes bioquímicos com a adição de três substratos fluorogênicos, aumentando assim a especificidade na identificação das espécies. Embora tenhamos utilizado a melhor metodologia disponível para a identificação dessas espécies, sabe-se que existem algumas limitações, uma vez que o sequenciamento genético certamente seria o melhor método a ser aplicado. No entanto, isto seria financeiramente inviável devido ao tamanho da amostra, provavelmente levando a nenhuma diferença no resultado do estudo.

No que diz respeito à obtenção das amostras através da saliva estimulada e não da placa dentária, isso se justifica por um conhecimento geral de que a saliva estimulada é um método melhor de coleta devido à sua homogeneidade e logística em comparação com a coleta de amostras a partir da placa dentária²⁴.

Quanto ao *S. oralis*, observamos um número significativamente maior desses micro-organismos no 7º dia de administração de PGB vs. momento basal ($P = 0,04$, Tabela 1). A amostra de saliva coletada no 7º dia de administração de PGB ocorreu durante o período de maior quantidade de concentração sérica de fármacos de acordo com Decourt e cols.²⁵. Esta é uma evidência da falta de influência da PGB sobre o microrganismo mais prevalente na placa bacteriana e um dos principais agentes etiológicos da endocardite infecciosa^{20,21,26}.

No presente estudo, não encontramos diferença estatística em relação aos valores de UFC/mL de saliva (Figura 1, $P = \text{NS}$) e CIMs (CIM₅₀ e CIM₉₀) de *S. sanguinis* e *S. oralis* (Tabela 2).

O uso crônico de penicilina G benzatina no grupo de estudo não alterou significativamente a susceptibilidade do *S. sanguinis* e *S. oralis* à penicilina G, como visto anteriormente⁷. É interessante notar a ocorrência de um aumento na resistência, ou nos valores de CIM, no *Streptococcus Viridans* e, portanto, um aumento no número de cepas resistentes a antibióticos isoladas em hemoculturas positivas para EI. No entanto, estes pacientes estavam recebendo terapia com antibióticos por via oral, e os intervalos de CIM diferem daqueles padronizados pelo CLSI para penicilina G^{7,27,28}.

Nossos resultados sobre a identificação de espécies corroboram os resultados de Bilavsky e cols.⁷. No entanto, discordamos em relação ao aumento da resistência à penicilina G do *Streptococcus Viridans*.

Este estudo contribuiu para despertar questionamentos sobre o tratamento clínico desses pacientes. Embora a American Heart Association (AHA) não recomende mais a profilaxia com antibióticos antes de procedimentos que causem bacteremia nesses pacientes, acreditamos que estudos adicionais sejam necessários no âmbito da população brasileira a fim de conhecer a nossa realidade, e então adaptá-la às mudanças sugeridas pela AHA. Enquanto aguardamos esses dados, seria prudente a continuidade à implementação das diretrizes da AHA de 1997, em que a profilaxia para endocardite infecciosa é recomendada para pacientes com doença valvar cardíaca antes dos procedimentos que causam bacteremia no trato geniturinário, trato respiratório e sistema estomatognático.

Nosso estudo também contribuiu para a interface entre medicina e odontologia, porque mostra que sob a ação prolongada da PGB não há diminuição dos principais microrganismos envolvidos na etiologia da endocardite infecciosa e, portanto, a profilaxia com antibióticos antes de procedimentos que causam bacteremia pode ser necessária.

Assim, estudos adicionais são necessários para verificar a necessidade de se estabelecer uma rotina especial para que esses pacientes possam passar por procedimentos odontológicos que poderiam causar bacteremia no 7º dia após a administração de PGB.

Este estudo mostrou que a administração de PGB a cada 3 semanas não alterou a colonização por *S. sanguinis*; mas a

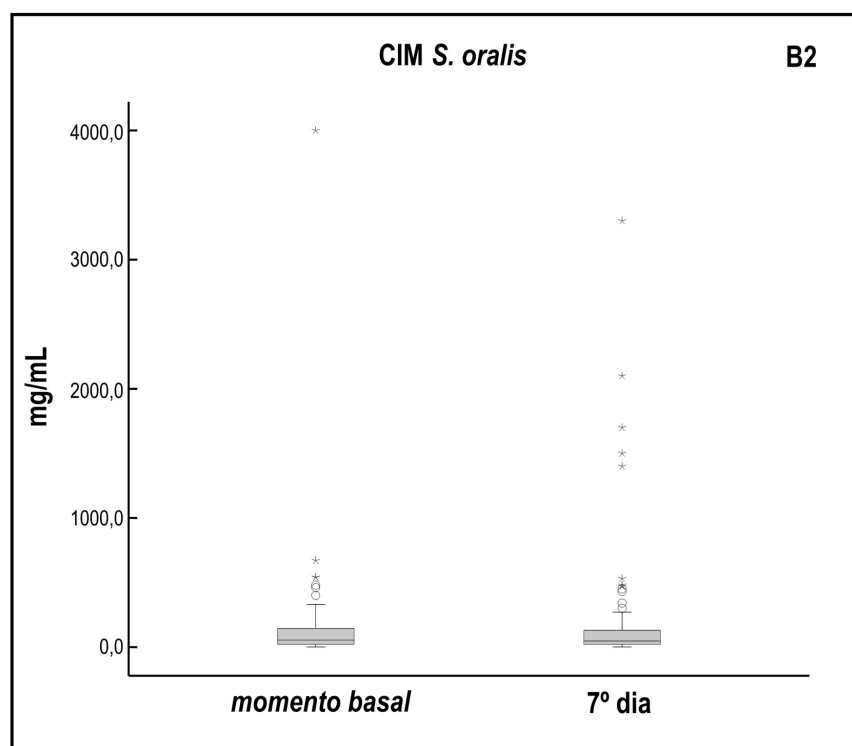
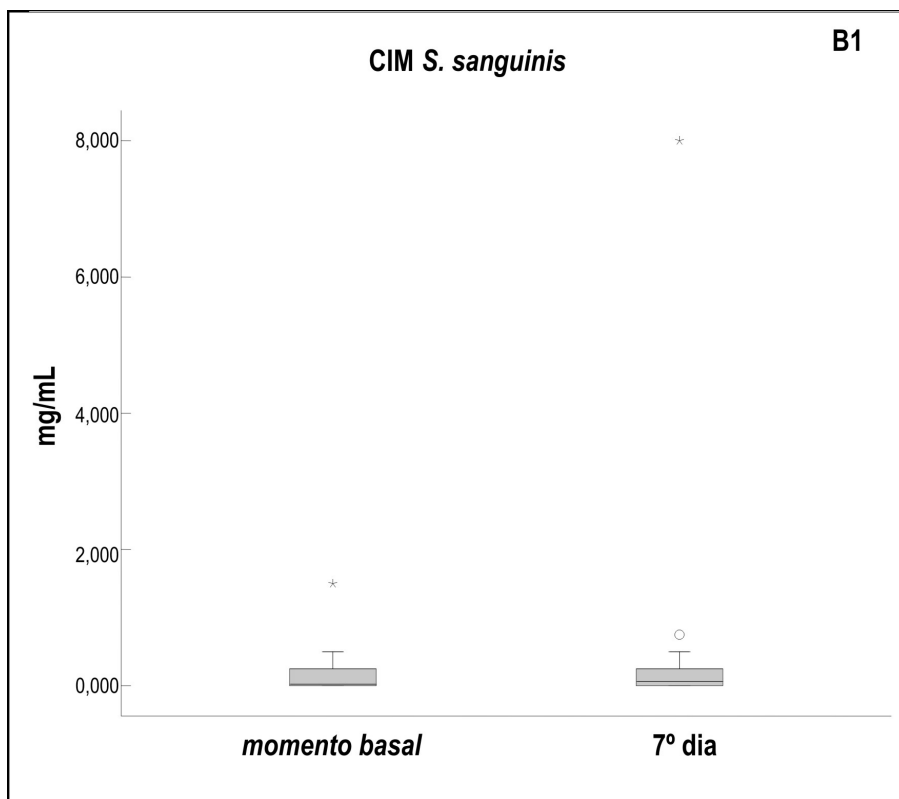


Fig. 2 – B1 — Distribuição de valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$ para *S. sanguinis*; B2 — distribuição de valores de CIM em $\mu\text{g/mL}$ para *S. oralis*.

Tabela 2 - CIM₅₀ e CIM₉₀ (µg/mL) e distribuição entre os grupos de acordo com a susceptibilidade do *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* à penicilina

	Momento basal‡		7º dia§	
	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. oralis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. oralis</i>
CIM ₅₀ *	0,190	0,250	0,250	0,250
CIM ₉₀ †	0,380	1,000	0,500	1,000
Sensível	45,5% (5/11)	44,8% (39/87)	33,3% (3/9)	41,1% (39/95)
Resistência intermediária	45,5% (5/11)	55,2% (48/87)	66,7% (6/9)	58,9% (56/95)
Alto nível de resistência	9% (1/11)	-	-	-

*CIM₅₀ — Concentração inibitória mínima da penicilina G para inibir 50% dos *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* suscetíveis; †CIM₉₀ — Concentração inibitória mínima de penicilina G para inibir 90% dos *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* suscetíveis; ‡Pacientes antes da dosagem de penicilina G benzatina; §Pacientes sob efeito do 7º dia de penicilina G benzatina. p =NS.

PGB aumentou a colonização de *S. oralis* no 7º dia seguinte ao da sua administração e, finalmente, a susceptibilidade do *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus oralis* à penicilina G não foi alterada durante o ciclo da penicilina G.

Agradecimentos

O grupo gostaria de agradecer o Dr. Luiz Antônio Machado César por sua contribuição em relação à coleta de dados. O grupo também deseja agradecer ao Dr. Walter Niccoli Filho pela sua ajuda na preparação deste manuscrito.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP e CNPq e parcialmente financiado pelo Instituto Fleury.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de André Andrade de Aguiar pela Faculdade de Medicina da USP.

Referências

1. Ayoub EM, Kotb M, Cunningham MW. Rheumatic fever pathogenesis. In: Stevens DL, Kaplan EL. (eds.). Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis. New York: Oxford Universe Press; 2000. p. 102-31.
2. Dajani AS, Bisno AL, Chung KJ, Durack DT, Gerber MA, Kaplan EL, et al. Prevention of rheumatic fever: a statement for health professionals by the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the young, the American Heart Association. *Pediatr Infect Dis J.* 1989;8(5):263-6.
3. Sampaio RO, Fae KC, Demarchi LM, Pomerantzeff PM, Aiello VD, Spina GS, et al. Rheumatic heart disease: 15 years of clinical and immunological follow-up. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(6):1007-17.
4. Snitcowsky R. Rheumatic fever prevention in industrializing countries: problems and approaches. *Pediatrics.* 1996;97(6 Pt 2):996-8.
5. Currie BJ. Are the currently recommended doses of benzathine penicillin G adequate for secondary prophylaxis of rheumatic fever? *Pediatrics.* 1996;97(6 Pt 2):989-91.
6. Kassem AS, Zaher SR, Abou Shleib H, el-Kholy AG, Madkour AA, Kaplan EL. Rheumatic fever prophylaxis using benzathine penicillin G (BPG): two-week versus four-week regimens: comparison of two brands of BPG. *Pediatrics.* 1996;97(6 Pt 2):992-5.
7. Bilavsky E, Eliahou R, Keller N, Yarden-Bilavsky H, Harel L, Amir J. Effect of benzathine penicillin treatment on antibiotic susceptibility of viridans streptococci in oral flora of patients receiving secondary prophylaxis after rheumatic fever. *J Infect.* 2008;56(4):244-8.
8. Darhous MS, Dahab OM, el Atar E, el Ghafary E. Dental, oral and bacteriological aspects in patients at risk of subacute bacterial endocarditis. *Egypt Dent J.* 1993;39(4):533-9.
9. Jensen JL, Karatsaidis A, Brodin P. Salivary secretion: stimulatory effects of chewing-gum versus paraffin tablets. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(4):892-6.
10. Dahlen G, Pipattanagovit P, Rosling B, Moller AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8(6):375-82.
11. Wayne PA. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute. MO2-A10. 2009;29(1):1-53.
12. Gold OC, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1973;18(11):1357-64.
13. Murray PR. Manual of clinical microbiology. Washington (DC):ASM Press; 2003.
14. Pezzlo M. Aerobic bacteriology. In: Isenberg HD. (ed.). Clinical microbiology procedures handbook. Washington, (DC): American Society for Microbiology Press; 1992. p. 1.20.5-1.20.6.
15. Sanchez-Perez L, Acosta-Gio AE. Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. *Arch Oral Biol.* 2001;46(1):49-55.

Artigo Original

16. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. In: Murray PR. (ed.). Manual of clinical microbiology. Washington (DC): ASM Press; 2003. p. 405-21.
17. Neves RS, Neves IL, Giorgi DM, Grupi CJ, César LA, Hueb WA, et al. Efeitos do uso da adrenalina na anestesia local odontológica em portador de coronariopatia. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(5):545-51.
18. Ministério da Saúde. Datasus. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasília;1996.
19. WHO. Oral health surveys. Basic methods. Geneva, 1977.
20. de Almeida PF, Franca MP, Santos SP, Moreira RS, Tunes UR. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. *R Ci Med Biol*. 2002;1(1):33-41.
21. Frandsen EV, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol Immunol*. 1991;6(3):129-33.
22. Herzberg MC. Oral Streptococci in health and disease. In: Stevens DL, Kaplan EL. (eds.). *Streptococcal infections: clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis*. New York: Oxford Universe Press; 2000. p. 333-70.
23. Ito HO. Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. *J Med Invest*. 2006;53(3-4):189-98.
24. Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity. *Arch Oral Biol*. 2005;50(3):341-5.
25. Decourt LV, Santos SR, Snitcowsky R, Pileggi F, Tsuzuki H, de Araujo Abreu AM, et al. [Serum levels of benzathine penicillin G after intramuscular administration]. *Arq Bras Cardiol*. 1983;40(1):3-8.
26. Jeon EH, Han JH, Ahn TY. Comparison of bacterial composition between human saliva and dental unit water system. *J Microbiol*. 2007;45(1):1-5.
27. Erickson PR, Herzberg MC. Emergence of antibiotic resistant *Streptococcus sanguis* in dental plaque of children after frequent antibiotic therapy. *Pediatr Dent*. 1999;21(3):181-5.
28. Hall GE, Baddour LM. Apparent failure of endocarditis prophylaxis caused by penicillin-resistant *Streptococcus mitis*. *Am J Med Sci*. 2002;324(1):51-3.