

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ALESSANDRA CASTRO ALVES

Cirurgiã Dentista

Estudo longitudinal das vias potenciais de transmissão de
Streptococcus mutans durante a colonização inicial de bebês
de creches públicas da cidade de Piracicaba (São Paulo)

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Doutor em Biologia
Buco-Dental. Área de concentração em
Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner

Co-orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Piracicaba

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

AL87e	Alves, Alessandra Castro. Estudo longitudinal das vias potenciais de transmissão de <i>Streptococcus mutans</i> durante a colonização inicial de bebês de creches públicas da cidade de Piracicaba (São Paulo). / Alessandra Castro Alves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. Orientadores: Renata de Oliveira Mattos-Graner, José Francisco Höfling. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Genotipagem. 2. Cáries dentárias. 3. Crianças. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira. II. Höfling, José Francisco. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em Inglês: Longitudinal study of potential sources of transmission of *Streptococcus mutans* during the initial colonization of children from public nurseries in Piracicaba (São Paulo)

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. DNA fingerprinting. 2. Dental caries. 3. Children

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Célia Regina Martins Delgado Rodrigues, Márcia Pinto Alves Mayer, Maria da Luz Rosário de Sousa, Reginaldo Bruno Gonçalves, Renata de Oliveira Mattos-Graner

Data da Defesa: 28-02-2007

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata ALESSANDRA CASTRO ALVES aprovada.

PROF.ª DR.ª RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

PROF.ª DR.ª MÂRCIA PINTO ALVES MAYER

PROF.ª DR.ª CÉLIA REGINA MARTINS DELGADO RODRIGUES

PROF. DR. REGINALDO BRUNO GONCALVES

PROF.ª DR.ª MARIA DA LUZ ROSARIO DE SOUSA

Agradecimentos Especiais

A Deus, eterno em vida e morte, e presente em fé em cada passo desta vida;

À minha mãe que está sempre comigo em todos os momentos, apoiando e dedicando-se sempre com compreensão e amor, meu especial obrigado por estar presente e testemunhando minhas especiais conquistas e todos caminhos trilhados.

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (Universidade Estadual de Campinas) por fazer parte da minha formação e contribuir com o meu engrandecimento;
- À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pela bolsa concedida durante o Curso de Doutorado na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP);
- À FAPESP pelo financiamento do projeto (Proc.02/07156-1);
- À Secretaria de Educação do Município de Piracicaba, em especial à Sueli Aparecida de Araújo Pereira, coordenadora do Programa de Educação e Saúde da Prefeitura de Piracicaba, pela permissão da execução do nosso projeto nas creches;
- Aos queridos Professores do Curso de Microbiologia e Imunologia, Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves e Prof. Dr. José Francisco Höfling pelo apoio, amizade, dedicação e excelência do curso;
- À querida Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner, meu especial obrigada, pelo incentivo, dedicação e profissionalismo durante a orientação da pesquisa;
- Às crianças colaboradoras desta pesquisa, seus pais e responsáveis, pela participação e disponibilidade durante o estudo, possibilitando e abrindo novos caminhos, muito obrigada;
- Às agentes de saúde e monitoras de todas as vinte e oito EMEIs de Piracicaba, pela compreensão, amizade, preocupação e disponibilidade durante as coletas e exames dos bebês;
- À Claudia Parússolo, coordenadora responsável pelas agentes de saúde das EMEIs de Piracicaba, meu agradecimento especial, pela boa vontade e atenção durante os momentos iniciais e de adaptação nesta pesquisa;

- À Dra. Yihong Li, do Departamento de Ciência Básica e Biologia Crânio-Facial da Universidade de Nova Iorque, Nova Iorque (E.U.A), pela colaboração dispensada nas análises dos géis e confecção dos dendogramas das crianças com amplitipos similares;
- Aos Professores e funcionários do CEPAE (Centro de Pesquisa e Atendimento para Pacientes Especiais): Prof. Dr. Antônio Bento Alves de Moraes, Dra. Rosana de Fátima Possobon, Dra. Cátia Elvira Scarpari e Sra. Maria Dolores, profissionais dedicados à atenção precoce e a promoção de saúde materno-infantil, meu muito obrigada, pelo atendimento e orientação aos bebês desta pesquisa;
- Ao Prof. Dr. Edgard Graner, meu agradecimento especial pela amizade e disponibilidade com as quais cedeu o laboratório e o termociclador da Patologia;
- A querida Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa, meu reconhecimento e admiração pela sua capacidade e compromisso com os alunos e sobretudo, minha amizade sincera;
- Aos Professores do Curso de Cariologia, Profa Dra. Cinthia Tabchoury, Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury e Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, um agradecimento especial pelos ensinamentos transmitidos e acolhimento em seus laboratórios durante o curso das disciplinas “Cariologia Básica” e “Cariologia *in vivo*”;
- Aos Professores da área de Histologia, em especial, ao Prof. Dr. Sérgio Line, pela atenção e disposição em ceder o laboratório e equipamentos durante a realização desta pesquisa;
- Aos meus queridos colegas e amigos do Curso de Doutorado em Microbiologia e Imunologia: Daniel Saito, Gustavo Alberto, Janaína Rodrigues, Letícia Barros, Marcelo Napimoga, Marlise Inês Klein, Paula Aníbal, Priscilla Mariano, Rafael Stipp, Regiane Kamyia, Rita Mardegan, Ruchele Nogueira e Vivian Furletti, pelos momentos de excelente convivência, coleguismo e trabalho;

- Aos meus amigos queridos “de todas ocasiões” Glauber, Renzo, Rodrigo e Rosana, meu especial obrigada por vocês compartilharem muitos momentos e alegrias comigo e, muitas saudades !;
- Aos colegas e amigos do Curso de Histologia: Marcelo, Isabel, Cristiane Salmon, Isabela, Alexandre, Cris, Fábio, Lisa, Marise, Daniel e Marcos, obrigada pelo companheirismo;
- Aos meus queridos colegas e amigos do Curso de Cariologia: Carol Aires, Livia, Cecília, Adriana, Carolina, Débora, Fernando, Tatiana, Max, Estela, Karine e Maria Paula, muito obrigada pela força;
- À colega Regiane Yatsuda, pelo convívio, amizade e conhecimentos transmitidos durante a pesquisa realizada na disciplina “Cariologia *in vivo*”;
- Aos técnicos do laboratório de Microbiologia, Wilma e Anderson, e a secretária e amiga, Flávia Pampolini, por todo auxílio prestado em momentos importantes e indispensáveis;
- A amiga Eli, do laboratório de Farmacologia, pelo carinho, atenção e colaboração em todos os momentos da disciplina “cariologia *in vivo*”; muito obrigada;
- Aos funcionários técnicos de laboratório da Cariologia, Alfredo e Waldomiro, meu agradecimento pelos auxílios prestados durante esta pesquisa e em momentos que estive cursando disciplinas na Cariologia;
- Aos meus colegas e amigos da Odontopediatria das Faculdades as quais leciono, UFBA, UEFS e UNIME, pelo incentivo, coleguismo, apoio e compreensão antes, durante e nos momentos em que estive ausente nas disciplinas durante o meu Curso de Doutorado na FOP: Profa. Celina Siquara, Profa. Iandira Pastor, Profa Sônia Vidal, Prof. Antístenes Neto, Prof. Paulo Tobias, Profa. Hervânia Costa, Profa. Susana Paim, Profa. Ana Isabel Scavuzzi, Profa. Ana Rita Guimarães, Prof. Alexandre Protásio, Prof. Ronald Paixão, Prof. Francisco Simões, Profa. Patrícia Sakima, Profa Mônica Franca e Prof. George Mariane. Muito obrigada, colegas;

- Aos meus queridos alunos das Universidades nas quais passo maior parte dos meus dias, me dedicando e sobretudo, crescendo com eles. Obrigada por vocês serem tão especiais;
- Aos meus amigos que tanto incentivaram e privaram-se da minha companhia, sendo compreensivos e verdadeiros amigos.

***“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim dentro do coração”
(Leonardo da Vinci)***

RESUMO

Crianças adquirem *Streptococcus mutans* durante os primeiros anos de vida, sendo a mãe a principal fonte de infecção. O objetivo deste estudo foi determinar a aquisição inicial de *S. mutans* em crianças que freqüentam creches, identificando as vias não familiares de transmissão, utilizando a reação em cadeia da polimerase, com *primer* arbitrário (AP-PCR). 160 bebês entre 5-13 meses de idade, freqüentando 28 creches públicas de Piracicaba (São Paulo) foram acompanhados por 18 meses. Os níveis de infecção por *S. mutans* nos bebês foram determinados no início e, a cada 6 meses. Foram realizados exames clínicos para verificação dos dentes erupcionados e lesões de cárie. Os perfis de AP-PCR dos isolados de *S. mutans* das crianças e dos 61 cuidadores das creches foram obtidos, assim como num subgrupo de 16 mães, cujas crianças apresentavam altos níveis de *S. mutans*. As cepas de *S. mutans* eram isoladas de amostras de saliva bucais, coletadas através de espátulas esterilizadas e inoculadas em MSB (Mitis Salivarius com Bacitracina). As placas eram incubadas a 37°C em microaerofilia e o número de colônias contadas em área determinada, sob lupa estereoscópica. Oito colônias por criança foram re-isoladas e genotipadas por AP-PCR com o *primer* OPA-02 e separadas em gel de agarose. Os ensaios de AP-PCR dos isolados de *S. mutans* nos bebês das mesmas creches, mães-filhos e bebês-cuidadores foram processados nas mesmas reações, separados em mesmo gel e comparadas visualmente. Os amplicons foram considerados similares ou iguais quando a maior parte das bandas eram idênticas. O subgrupo de amplitipos considerados idênticos ou muito semelhantes pela análise visual, tiveram o coeficiente de similaridade de *Dice* determinado com *Fingerprinting II informatix software*. *S. mutans* foram isolados da cavidade bucal dos bebês a partir de 6 meses de idade. No *baseline*, a prevalência de *S. mutans* foi 5,6%, aumentando para 15,6% em T6 (seis meses), 32,1% em T12 (doze meses) e 40,3% ao final do estudo (T18). A mediana da aquisição de *S. mutans* foi de 21 meses. Foram identificados de um a quatro amplitipos distintos por criança.

Foram identificadas no total 16 crianças freqüentadoras das mesmas creches compartilhando amplitipos de *S. mutans* similares, sugerindo transmissão horizontal entre crianças. Das mães examinadas, 68,8% apresentaram altos níveis de *S. mutans*, variando de 1-4 amplitipos. Apresentaram coincidência de amplitipos 50% dos pares mãe-filho analisados. A análise genotípica dos isolados dos cuidadores e bebês não revelou coincidência, apesar dos altos níveis de *S. mutans* nos cuidadores (51,5%). A detecção precoce de *S. mutans*, associada comumente a altos níveis de infecção e diversidade de amplitipos indicam alta exposição a *S. mutans* durante os primeiros dois anos de idade. A detecção de crianças da mesma creche compartilhando o mesmo amplitipo de *S. mutans* indica ocorrência de transmissão horizontal de *S. mutans* nesta população. Estes dados são compatíveis com a freqüência relativamente baixa de similaridade de amplitipos observada entre os pares mãe-filhos(as).

Palavras-chave: Genotipagem, Cáries dentárias, Crianças, *S. mutans*.

ABSTRACT

Children are more likely to acquire *Streptococcus mutans* in the oral cavity during the early years of their lives. The mothers are often the main source of *S. mutans* transmission. This study aimed to identify non-mother potential sources of *S. mutans* transmission in a population of nursery children during the period of initial colonization, using arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). 160 infants from 28 public nurseries schools of the city of Piracicaba (Brazil), with initial age between 5-13 months, were enrolled in this prospective study. Levels of *S. mutans* infection were determined during a 18-month follow-up period, in which children were examined at each 6-month period. Number of erupted teeth and caries were also analyzed. AP-PCR profiles of the children *S. mutans* isolates were also obtained with the amplicons of the *S. mutans* strains that were isolated from their 61 respective day-care nurses. *S. mutans* isolates obtained from a subset of sixteen mothers whose children harbored high levels of *S. mutans* were also analyzed by AP-PCR. *S. mutans* strains were isolated from samples of saliva that were collected with tongue blades and inoculated onto MSB (Mitis Salivarius and Bacitracina). Plates were incubated at 37°C for 48 hours. The number of *S. mutans*-like colonies was determined using a stereoscopic microscope. Eight isolates of *S. mutans* per subject were picked up from each plate and pure cultures stored. Genomic DNA purified from the isolates were subjected to AP-PCR using OPA-02. PCR products were electrophoretically resolved in agarose gels. Comparisons of AP-PCR amplicon profiles were performed between children attending the same nursery, and between children and their respective nurse and/or mother by side-by-side visual comparison. Amplicons were considered similar when all major bands were identical. The degree of similarity of a subset of visually matching strains were also analyzed with the help of the *Fingerprinting II informatix software*. *S. mutans* were isolated from children as young as 6 months of age. At baseline (T0), *S. mutans* were detected in 5.6% of the children. This prevalence increased to 15.6, 32.1 and 40.3% respectively at the subsequent

follow-up periods (T6, T12, T18). The median age of initial acquisition was 21 months. Children harbored one to four distinct amplicotypes. A subset of 16 children carried the same amplicotype of their nursery mates in at least one of the phases of the study, suggesting child-child horizontal *S. mutans* transmission. Amplicotype matching among mother-child pairs were detected in 50% of the subset analyzed indicating transmission from mothers to their children. Sixty-eight percent of the mothers were heavily infected. Mothers were colonized by one-four amplicotypes. Although most of the nurses harbored high levels of *S. mutans* (51.5%), their *S. mutans* amplicotypes did not match amplicotypes detected in their respective children. Nursery children may be colonized by diverse *S. mutans* genotypes during the first two years of age in the studied population, and that children may acquire *S. mutans* by child-child horizontal transmission. That is compatible with the relative low prevalence of *S. mutans* amplicotype matching among child-mother pairs.

Key-words: *DNA fingerprinting, Dental caries, Children, S. mutans*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. PROPOSIÇÃO	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	86
ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível, cujo principal patógeno é o *Streptococcus mutans*, (LOESCHE, 1986). Estudos a respeito da aquisição de *S. mutans* apontaram a colonização bucal infantil ocorrer em torno de 19 a 31 meses de idade (CAUFIELD *et al.*, 1993). A infecção nesta fase representa um grande risco ao desenvolvimento futuro da doença em idade precoce, sendo os casos mais severos aqueles em que lesões são detectadas em dentes decíduos recém irrompidos (KÖHLER *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1994; ANSAI *et al.*, 2000). Sabe-se ainda que quanto mais precoce e severa a infecção por *S. mutans*, mais difícil o controle da cárie dental com o avanço da idade (KÖHLER *et al.*, 1988). Em acréscimo aos fatores ambientais e do hospedeiro, genótipos específicos de *S. mutans* podem ser colonizadores mais agressivos, resultando em um biofilme dental mais cariogênico (KÖHLER & KRASSE, 1990; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000).

Crianças são infectadas normalmente através de contactos com indivíduos da família, os quais representam contatos próximos e freqüentes (BERKOWITZ & JORDAN, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993; KOZAI *et al.* 1999). As mães são indicadas como a principal fonte de infecção, como demonstrado em inúmeros estudos de isolados clínicos de *S. mutans*, onde características genotípicas e/ou fenotípicas similares foram encontradas em cepas de origem materna e dos bebês (DAVEY & ROGERS, 1984; LI & CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KOZAI *et al.*, 1999; KLEIN *et al.*, 2004; ESIN *et al.*, 2006). Estudos demonstram ainda que mães com altos níveis de infecção por *S. mutans* transmitem este patógeno com mais freqüência a seus filhos e estes são colonizados precocemente (KÖHLER *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2000; ESIN *et al.*, 2006). Vias alternativas de transmissão foram sugeridas entre outros membros da mesma família, como os pais (KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON & THORNQVIST, 2000; ERSIN *et al.*, 2004; ESIN *et al.*, 2006). Por outro lado, a transmissibilidade horizontal foi recentemente relatada em dois estudos,

implicando na possibilidade do agente patogênico ser adquirido também em ambiente extrafamiliar (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002). A transmissão de *S. mutans* através da saliva poderia ocorrer, principalmente em ambientes como creches/escolas, onde crianças compartilham objetos como brinquedos, chupetas e mordedores. Outra situação favorável de contaminação neste local poderia ser compreendida observando-se o contacto estreito existente entre os bebês e babás ou auxiliares de saúde. Estas “babás”, como as mães quando altamente infectadas, poderiam consistir em fontes não-familiares de transmissão de *S. mutans*. As creches públicas atendem a uma grande parcela da população, principalmente as de menor nível-sócio econômico. Estas instituições representam, portanto, um alvo importante para o desenvolvimento de programas de controle da cárie dental. Para tanto, se faz importante investigar as principais vias de transmissão inicial de *S. mutans* nestas populações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1 Estudos de prevalência de cárie dental em bebês no Brasil

Anteriormente, alguns poucos estudos em diferentes cidades brasileiras foram pioneiros na avaliação das condições de saúde bucal de crianças em tenra idade (0 - 3 anos). Em 1993, MORITA *et al.*, observaram 10% das crianças com 12 meses com cavidades de cárie, este percentual aumentando para 50% entre as crianças de 36 meses. Em 1996, dois estudos mereceram destaque: FREIRE *et al.* observaram uma prevalência de cárie de 4% para crianças de 0 a 12 meses, aumentando para 13% e 30% entre crianças de 2 e 3 anos de idade. Bezerra (1990), estudando uma população de crianças entre 30-36 meses de idade na cidade de Brasília, encontrou uma prevalência de 61,3% considerando além das cavidades de cárie, as lesões iniciais do tipo mancha branca ativa. Em 1996, TOMITA *et al.* verificaram 11% das 52 crianças da amostra entre 0 e 2 anos de idade apresentando cavidades de cárie; tal prevalência aumentou na faixa dos 3-4 anos para 26%. Ainda em 1996, WALTER *et al.*, relataram uma prevalência de cárie de 34% entre bebês de zero a 30 meses, onde se observava uma característica muito peculiar e condizente com dados mundiais (WENDT *et al.*, 1991; WEINSTEIN *et al.* 1992): o aumento da prevalência de cárie entre o primeiro e o segundo ano de vida. Portanto, grande parte da população menor de três anos, que era desassistida de atendimento odontológico, já apresentava necessidades curativas mesmo antes do primeiro exame. As características destrutivas deste tipo de cárie, atingindo idade precoce e em alta prevalência, tornam-na um padrão requerendo atenção especial. O diagnóstico precoce das lesões iniciais, ainda em estágio reversível, e a avaliação dos fatores determinantes tornam-se fundamentais no estabelecimento de um tratamento mais simples, menos invasivo e de menor custo, envolvendo o uso de agentes fluoretados e, sobretudo, mudanças comportamentais com relação à dieta e higiene bucal (WEINSTEIN *et al.*, 1992).

As condições de saúde bucal dos pré-escolares não têm sido documentadas na mesma extensão que a dos escolares, uma vez que a dentição decídua, freqüentemente, não é considerada de tanta importância quanto a permanente no planejamento de ações (TOMITA *et al.*, 1996). Por outro lado, o conhecimento sobre a experiência de cárie na dentição decídua é importante como preditor da doença cárie na dentição permanente. Entretanto, sugere-se este preditor ter valor reduzido na identificação do risco à doença em crianças menores de três anos, devido à baixa prevalência de lesões nesta fase (O'SULLIVAN & THIBODEAU, 1996). Ainda, deve-se considerar que a identificação do risco seja realizada antes mesmo do desenvolvimento das lesões visando permitir o controle da doença. BÖNECKER *et al.* (2002) citam a escassez de publicações as quais procuram verificar o padrão da doença em dentes decíduos, particularmente em crianças pré-escolares abaixo dos 3 anos de idade.

MATTOS-GRANER *et al.* (1996) avaliaram a prevalência de cárie dentária em 322 crianças matriculadas em creches de Piracicaba (São Paulo), com idades variando entre 6 e 36 meses de vida. Observaram que as menores faixas etárias em que se observou a presença de lesões de cárie iniciais esteve entre 6 e 12 meses de idade e, lesões cavitadas entre 13 e 18 meses. O percentual de crianças livres de cárie foi de 65%, sendo que 5,9% da amostra total apresentou 46% do total de lesões, caracterizando o fenômeno da polarização e a necessidade da identificação precoce de crianças com maior risco para o desenvolvimento da doença.

No ano 2000, LEITE & RIBEIRO avaliaram o estado de saúde bucal de 338 crianças de 2 a 6 anos de idade, atendidas em creches públicas na cidade de Juiz de Fora (Minas Gerais). Os dados mostraram ceo-d médio de 0,7 para as crianças de dois anos e o dobro (1,4) para as de três anos. O início da lesão cavitada foi observado mesmo nas crianças de menor idade, refletindo nesta faixa as dificuldades dos sistemas de serviços de saúde em atingir esta população. Os autores comentam de modo imperativo uma mudança no perfil de atendimento

para esta faixa da população como medida prioritária, e orientação pré-natal a grupos de mães visando encorajar hábitos bucais saudáveis.

Em 2001, BARROS *et al.* realizando estudo na cidade de Salvador (Bahia), examinaram 340 crianças atendidas em creches estaduais entre 0 e 30 meses de idade. A prevalência de cárie considerando-se todos os estágios da lesão foi de 55,3%, sendo os incisivos superiores os dentes mais afetados e representando 80% do total de lesões para estes dentes. Os índices de ceo-d encontrados foram: 0,35 para as crianças de 0-12 meses; 1,32 para 13-24 meses e 2,38 para 25-30 meses, considerando as lesões incipientes.

BÖNECKER *et al.* (2002) com o objetivo de verificar as alterações na prevalência e severidade da cárie em pré-escolares em Diadema (São Paulo), utilizaram os resultados obtidos através da realização de levantamentos epidemiológicos em 1995, 1997 e 1999. O primeiro incluiu 548 crianças de 5-35 meses, e o segundo e terceiro, respectivamente incluíram 992 e 690 bebês de 5 a 59 meses, selecionadas durante o Dia Nacional da Vacinação. Verificou-se uma marcante redução na prevalência e severidade das lesões rampantes entre 1995 e 1999. Houve redução de 36,5% nas crianças de 2 anos de idade entre 1995 e 1997 e de 36% entre 1997 e 1999. O ceo-s médio foi reduzido de 2,0, em 1995 a 1,0, no ano de 1999.

ROSENBLATT & ZARZAR (2004) estudaram uma amostra de 468 bebês (meninos e meninas) entre 12 e 36 meses de idade com o propósito de avaliar a ocorrência da cárie de mamadeira e sua relação com o tipo e duração da alimentação, em famílias de baixa renda na cidade de Recife (Pernambuco). A prevalência de cárie foi de 28,4% (133 crianças). Duzentas e oito crianças faziam 5 ou mais refeições por dia com alto teor de sacarose, e 33,6% destas apresentavam lesões cariosas. Nenhuma associação significativa foi observada entre a presença de lesões de cárie e a amamentação no peito. A cárie de mamadeira entre os bebês aumentou em função da idade, número de lanches açucarados entre as refeições e ainda, com uma refeição principal cariogênica. No total, 327 crianças faziam uso da mamadeira contendo leite e açúcar. Para os

bebês de 12 a 18 meses, o ceo-d médio foi de 0,4; aumentando para 1,47 nas crianças de 19 a 24 meses e, 2,0 para as de 25-36 meses de idade.

2. 2 Aquisição inicial e colonização de bebês por S. mutans

As superfícies do corpo humano são colonizadas por vários microrganismos, especialmente bactérias, constituindo a microbiota residente. A diversidade sofre influência de fatores ambientais e inatos. No indivíduo, o nascimento separa a vida intra-uterina estéril da existência extra-uterina com uma contínua exposição a inúmeros microrganismos. Muitos são apenas transitórios, enquanto outros se estabelecem encontrando superfícies favoráveis a serem colonizadas de forma permanente. Bebês com o ecossistema bucal em desenvolvimento podem ser particularmente susceptíveis à colonização microbiana em função, por exemplo, de anticorpos específicos capazes de inibir aderência bacteriana, estarem em baixos níveis na infância precoce. Por outro lado, durante os primeiros meses de vida, apenas mucosas estão disponíveis à colonização e este fato limita a diversidade de espécies. Finalmente, cepas bacterianas parecem depender de diversos períodos de susceptibilidade para se estabelecerem na cavidade bucal (KÖNÖNEN, 2000).

Interações entre diferentes formas bacterianas bem como entre os microrganismos e o hospedeiro são fatores controladores da homeostasia ou desequilíbrio, podendo gerar condições patológicas. A microbiota residente ou indígena da cavidade bucal é um componente integral ativo neste sítio para o organismo. Bactérias comensais, portanto, beneficiam o hospedeiro defendendo contra patógenos invasores. Entretanto, algumas espécies ou clones da microbiota bucal podem apresentar características em detrimento à saúde bucal do indivíduo (KÖNÖNEN *et al.*, 1999).

A aderência de microrganismos às diversas superfícies ocorre de um modo seletivo e isso caracteriza o evento inicial da colonização microbiana. O número de células viáveis e sua habilidade de aderência funcionam como pré-

requisitos para o sucesso da colonização e sucessão microbiana (GIBBONS, 1984).

Durante a erupção dentária no bebê, superfícies não descamativas estarão disponíveis e susceptíveis à colonização. Muitos sítios tornam-se presentes para aderência, tais como sulco gengival e inúmeras superfícies do esmalte dental (BERKOWITZ, 2003). A adesão microbiana entre espécies dará origem a comunidades multigenéricas no biofilme em desenvolvimento, e a especificidade é uma característica importante na composição inicial do mesmo.

Muitos estudos mostraram os *S. mutans* necessitarem de superfícies duras e não descamativas para estabelecimento e colonização (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993; BERKOWITZ, 1996). Entretanto, existem também relatos da presença destes microrganismos em amostras coletadas de bebês edêntulos em idade bastante jovem (MILGROM *et al.*, 2000; WAN *et al.*, 2001a,b; TANNER *et al.*, 2002a,b). Para que ocorra colonização se fazem necessárias superfícies não descamativas, como dentes recentemente erupcionados (CAUFIELD *et al.*, 1993). O número de dentes erupcionados tem mostrado forte associação à frequência de isolamento dos *S. mutans* (CATALANOTTO *et al.*, 1975; FUJIWARA *et al.*, 1991; CAUFIELD *et al.*, 1993).

Foi sugerido que o sucesso da colonização da cavidade bucal infantil apresenta grande dependência da magnitude da inoculação. Os níveis de infecção materna e a frequência do inóculo direto ou indireto (BERKOWITZ *et al.*, 1996; AALTONEN & TENOVUO, 1994; ANSAI *et al.*, 2000) apresentam relação direta com os níveis de infecção bucal infantil. LI & CAUFIELD (1995) abordaram ainda a erupção precoce dos dentes decíduos como um fator predisponente à maior susceptibilidade da aquisição e colonização inicial por *S. mutans* nos bebês devido a um ambiente propício.

Outros fatores foram sugeridos e intensamente discutidos com relação à influência na colonização de bebês por *S. mutans*, tais como, o desenvolvimento imunológico da criança (SMITH *et al.*, 1998), a presença de hipoplasias dentárias (LI *et al.*, 1994; MILGROM *et al.*, 2000) e presença de anomalias de

desenvolvimento nos rodets gengivais, como os nódulos de *Bohn* citados em um estudo por WAN *et al.*, (2001a). A presença freqüente de uma dieta cariogênica, como o alto teor de sacarose também seria um fator modulador no padrão de aquisição de *S. mutans* (KÖHLER & BRATTHALL, 1978; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; WAN *et al.*, 2003).

Na prevenção da doença cárie, a determinação da época de infecção por *S. mutans* se faz importante já que diferenças culturais e sócio-econômicas entre populações podem representar variáveis determinantes. Estudos prospectivos demonstraram que *S. mutans* se implantam mais tardiamente na cavidade bucal de crianças em comparação aos outros estreptococos orais e outras bactérias, como as gram-negativas (CARLSSON *et al.*, 1970; CAUFIELD *et al.*, 1993; KÖNÖNEN *et al.*, 1994; CAUFIELD *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002; TANNER *et al.*, 2002b; LI *et al.*, 2005). Em 1993, SMITH *et al.* observando bebês em fase de erupção de incisivos decíduos, verificaram que apenas 7% destes apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans*, em comparação aos 100% da amostra colonizada por *S. mitis* (biovar 1), 79% por *S. salivarius* e 50% por *S. sanguis*. CAUFIELD *et al.* (1993) em estudo longitudinal acompanhando 46 bebês do nascimento aos 5 anos de idade, detectaram *S. mutans* em 21% das crianças com 19 meses de idade e em 62% das crianças aos 31 meses. As crianças que mantiveram-se com níveis indetectáveis de *S. mutans*, mantiveram-se também livres de lesões cariosas. Neste trabalho clássico, os autores conceituaram o período etário de 19 aos 31 meses como o de maior susceptibilidade à aquisição de *S. mutans*. Foi denominado “**janela de infectividade**” pelos autores, e esteve relacionado ao período de erupção dos molares decíduos, onde as superfícies apresentam-se mais retentivas e uma área maior para aderência se faz presente, favorecendo a colonização.

Em estudo epidemiológico transversal realizado com crianças brasileiras de 12 a 31 meses de idade, na cidade de Piracicaba (São Paulo), MATTOS-GRANER *et al.* (1998) verificaram 70,8% de infecção por *S. mutans* aos 19 meses de idade. Mostraram também alta correlação entre os níveis salivares de *S.*

mutans na cavidade bucal dos bebês e a prevalência de cárie dental nos mesmos durante o período de acompanhamento.

Estudando 199 crianças de 06 a 36 meses de idade, MILGROM *et al.* (2000) estabeleceram associações entre prevalência de lesões cariosas e hipoplasia de esmalte, higiene bucal precoce, dieta e infecção por *S. mutans*, utilizando técnicas de biologia molecular. Vinte e cinco por cento dos bebês edêntulos apresentavam-se infectados por *S. mutans*.

ANSAI *et al.* (2000) em um estudo de análise de sobrevivência com amostra de 131 crianças japonesas de 06 meses a 6 anos de idade, examinaram no *baseline* fatores salivares como risco ao desenvolvimento de lesões cariosas durante o período de acompanhamento de 2 anos. As crianças pertenciam ao jardim de infância onde não havia nenhum programa específico de saúde bucal comunitário. Aproximadamente 90% das crianças com altos níveis de *S. mutans* no *baseline*, apresentaram lesões cariosas 9 meses depois, em comparação aos 23% dos bebês com níveis não detectáveis de *S. mutans* que também apresentaram lesões. Os resultados obtidos através de análise de regressão apresentaram uma forte correlação entre os níveis salivares de *S. mutans* no *baseline* e o aparecimento de lesões de cárie nas crianças.

WAN *et al.* (2001b) através de método de cultura, detectou a presença precoce de *S. mutans* em 60% das 172 crianças edêntulas, a partir dos seis meses de idade. Estes resultados foram confirmados em um segundo momento de avaliação, três meses depois da primeira colheita, comprovando a real infecção e estabelecimento da microbiota residente.

TEDJOSASONGKO & KOZAI (2002) buscaram determinar a época de colonização inicial por *S. mutans* em bebês japoneses, realizando coletas mensais durante 30 meses em 39 crianças com idades iniciais entre zero a cinco meses. A aquisição foi maior na faixa dos 12 aos 25 meses de idade, coincidindo com a erupção dos dentes posteriores.

Ainda em 2002, TANNER *et al.* observaram a aquisição de *S. mutans* mesmo em bebês edêntulos em torno dos seis meses de idade. A presença de *S.*

mutans esteve em 70% dos 57 bebês com menos de 18 meses, utilizando técnicas moleculares.

Wan *et al.* (2003) acompanhando longitudinalmente a mesma amostra estudada em 2001 (WAN *et al.*, 2001b), durante o período da erupção dentária, observaram que a idade média de aquisição de *S. mutans* foi de 15,7 meses de vida. Aos dois anos de idade, 84% da amostra já estava colonizada. Encontraram uma forte associação entre o estabelecimento de *S. mutans* nos bebês e os níveis salivares de *S. mutans* maternos e, ainda com relação à utilização freqüente do hábito da mamadeira noturna contendo sacarose. Por outro lado, crianças cujas mães realizavam higiene bucal freqüente nas mesmas, apresentaram-se como não colonizadas ou com baixos níveis de colonização por *S. mutans*.

KLEIN *et al.* (2004) monitoraram 16 pares mães/bebês pela reação em cadeia da polimerase com dois *primers* arbitrários (OPA-02 e OPA-13) durante 20 meses, bimensalmente. A média de idade de aquisição de *S. mutans* da amostra esteve em torno dos 15,4 meses de idade. Ao longo do estudo, pode-se identificar *S. mutans* em todos os indivíduos da amostra, tanto mães quanto bebês.

LI *et al.* (2005) averiguaram alguns fatores perinatais que podem influenciar na aquisição de *S. mutans* em bebês e seus potenciais efeitos no desenvolvimento da doença cárie em um estudo de Coorte com 156 pares mães/crianças. Foi observado que as crianças nascidas de parto cesárea adquiriram *S. mutans* 11,7 meses mais precoce que as crianças nascidas de parto normal. A média de aquisição da amostra total foi de 22,3 meses de idade, com 35,3% dos 156 bebês apresentando níveis detectáveis. Por outro lado, o grupo das crianças nascidas de parto normal apresentou uma média de 28,8 meses quando comparada aos 17,1 meses do grupo de parto cesárea. A hipótese dos autores foi a menor exposição à microbiota materna ao nascimento nas crianças de parto cesáreas, gerando uma precocidade na aquisição dos *S. mutans* a posterior. Entretanto, não ficou muito claro como esta colonização inicial por microrganismos totais influenciaria na colonização por *S. mutans* dois anos mais tarde. Talvez a resposta fosse realmente a competitividade durante a sucessão microbiana na

colonização de sítios da cavidade bucal. Não houve correlação da idade da aquisição com fatores tais como: gênero do bebê, peso ao nascimento ou experiência de amamentação. Com relação aos fatores maternos, os níveis salivares de *S. mutans* maternos apresentaram correlação com a colonização infantil.

ESIN *et al.* (2006) estudaram a transmissão intrafamiliar de cepas de *S. mutans* em um grupo de 56 bebês (média de 33,8 meses) pertencentes a uma creche privada, localizada em área urbana em uma cidade da Turquia e seus pais de alto nível sócio-econômico. Encontraram uma prevalência maior de *S. mutans* (26 de 37) para o grupo de crianças maiores ou iguais a 26 meses de idade, quando comparada ao grupo de menor faixa etária. *S. mutans* foram isolados em 33 (58,9%) crianças do total da amostra.

2. 3 Transmissibilidade de *S. mutans*

Os métodos de estudo da transmissão de *S. mutans* incluem caracterizações fenotípicas (bacteriocinotipagem), sorotipagem e caracterizações genotípicas tais como: perfil de DNA plasmidial, análises com endonucleases (REA), reação em cadeia da polimerase com utilização de *primers* arbitrários (AP-PCR) e ribotipagem. Embora cada método tenha seu próprio perfil, as técnicas baseadas em traços genotípicos são mais fidedignas e confiáveis que os métodos fenotípicos, já que as primeiras avaliam o DNA do microrganismo estudado (CAUFIELD & WALKER, 1989). A técnica de AP-PCR é relativamente fácil e rápida de executar comparados aos demais métodos de tipagem molecular, sendo bastante atrativa na atualidade. A sua maior vantagem é a não necessidade do conhecimento prévio da seqüência de DNA do microrganismo alvo. Os resultados da técnica mostram um poder discriminatório excelente com relação à habilidade na diferenciação entre clones de *S. mutans* em amostras clínicas (SAARELA *et al.*, 1996; LI & CAUFIELD, 1998; NAPIMOGA *et al.*, 2004).

Não está bastante claro ainda se existem variações em diferentes populações e países, com relação à distribuição intrafamiliar e na transmissão de clones de *S. mutans* (LI *et al.*, 2000; ESIN *et al.*, 2006), em função das diferenças culturais as quais influenciam o grau de contato entre crianças e seus pais e, sobretudo com outros indivíduos. Por exemplo, genótipos coincidentes foram determinados em 71% dos pares mães/bebês em estudo com população americana (LI & CAUFIELD, 1995). Entretanto, esta frequência foi menor em famílias suecas onde apenas 24% dos bebês de três anos de idade mostraram similaridade genotípica com suas mães e nenhum dos pais avaliados (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998). No Japão, 31,4% dos genótipos encontrados em crianças de 0-11 anos de idade foram similares aos detectados nos pais (KOZAI *et al.*, 1999). Ainda, Van HOUTE e GREEN (1974) relataram que o sucesso da transmissão entre hospedeiros humanos é complexo e dependeria de uma série de fatores inter-relacionados, incluindo a afinidade microbiana aos sítios de colonização e número de células infectantes viáveis para aderência.

A principal fonte de infecção por *S. mutans* em crianças são as mães (LI & CAUFIELD, 1995). A fidelidade de transmissão de *S. mutans* maternal para seus filhos, conhecida como transmissão vertical, foi avaliada através de análise do padrão de inibição de bacteriocinas contra diferentes cepas indicadoras (BERKOWITZ & JORDAN, 1975), demonstrando que as mães apresentam cepas de *S. mutans* com igual padrão de produção de bacteriocinas (mutacinas) de pelo menos uma cepa isolada de seus filhos. Posteriormente, ROGERS (1980) verificou por bacteriocinotipagem, que membros de uma mesma família podiam compartilhar cepas de *S. mutans* com mesmo padrão mutacinogênico. Neste mesmo estudo, examinaram ainda isolados de crianças compartilhando o mesmo ambiente na escola, porém os resultados obtidos mostraram a não transmissão entre eles.

Na atualidade, os estudos na área de biologia molecular vêm utilizando o DNA bacteriano de *S. mutans* como uma marca epidemiológica nas pesquisas de transmissão deste agente (CAUFIELD *et al.*, 1988; LI & CAUFIELD, 1995).

Estudos de genotipagem também indicam a mãe como principal rota de aquisição primária de *S. mutans* para os bebês - transmissão vertical (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER, 1989; LI & CAUFIELD, 1995; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; KLEIN *et al.*, 2004). Em contra-partida, inúmeros estudos apresentam resultados novos com relação à transmissão, onde a detecção de genótipos diferentes em crianças e que não foram encontrados nas respectivas mães ou outros familiares sugerem rotas alternativas de transmissão de *S. mutans*, como por exemplo, a transmissão horizontal (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999; REDMO EMANUELSSON & THORNQVIST, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002; KLEIN *et al.*, 2004).

A técnica de análise com enzima de restrição – REA (*restriction enzyme analyses*) foi utilizada por KULKARNI *et al.* (1989) para caracterizar cinco famílias de origens culturais e idades diversificadas com relação aos perfis genotípicos de *S. mutans* das cepas isoladas de 58 indivíduos. Em cada indivíduo foram isoladas 19 cepas, onde foi possível se observar genótipos similares entre os membros das mesmas famílias. Os autores observaram ainda a presença de genótipos extrafamiliares em alguns indivíduos, porém em menores números. A diversidade genotípica observada foi bastante grande entre os escolares estudados, variando de 1 a 5 clones.

No mesmo ano, CAUFIELD & WALKER (1989), utilizando a mesma metodologia e estudando dez isolados de *S. mutans* por indivíduo provenientes de três pares mães/filho, encontraram altos padrões de similaridade entre cepas das crianças com as respectivas cepas maternas. Neste estudo, as crianças estudadas estavam na fase inicial de aquisição de *S. mutans*, em torno dos 14,7 meses de idade, quando apresentaram perfis genotípicos coincidentes aos maternos, denotando transmissão vertical. As crianças desta amostra apresentaram um único perfil clonal.

Em 1996, ALALUUSUA *et al.*, estudando doze crianças de 18 a 36 meses de idade, em dois grupos, cárie ativas (cárie de mamadeira) e sem

atividade cariosa, investigaram diversidade e similaridade genotípicas das cepas de *S. mutans* isolados do biofilme dental das crianças e das amostras de saliva maternas. Realizaram técnica de ribotipagem com três a treze isolados de *S. mutans* por indivíduo que mostraram similaridade entre as cepas isoladas dos pares mães/filhos. Durante a análise da diversidade clonal, as crianças do grupo livre de cárie, normalmente estiveram colonizadas por um único perfil, enquanto as crianças do grupo com cárie apresentavam-se colonizadas por mais de um ribotipo, similarmente às suas respectivas mães. Além da maior diversidade de clones, o grupo de crianças com lesões cariosas apresentavam altas contagens de *S. mutans* no biofilme dental. No estudo de KREULEN *et al.* (1997) através de técnica de AP-PCR, por outro lado, os mesmos sugeriram que clones específicos de *S. mutans* podem ser selecionados em crianças com alta atividade de cárie em função das condições ambientais adversas e de baixo pH na cavidade bucal, devido ao consumo excessivo de sacarose. Os autores encontraram maior diversidade genotípica entre as crianças livres de cárie (2-5 clones) em comparação àquelas com cárie de mamadeira (um clone).

Dois estudos (1998) utilizando análise com endonucleases para verificar transmissibilidade intrafamiliar de genótipos de *S. mutans*, apresentaram resultados contrários. O primeiro deles foi realizado em 11 famílias chinesas, dentre as quais sete (63,6%) apresentaram similaridade entre genótipos, incluindo mães, pais e crianças (REDMO EMANUELSSON & WANG, 1998). O segundo, realizado em 25 famílias suecas (crianças, pais e mães) apresentaram resultados diferentes, quando não foi possível serem encontrados genótipos similares entre as crianças e os pais. Um considerável número de genótipos nas crianças avaliadas era de origem extrafamiliar (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998). Neste estudo, nove das onze crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* albergavam apenas um genótipo e duas crianças, dois genótipos.

MATTOS-GRANER *et al.* (2001b) avaliaram uma coorte de 35 crianças brasileiras infectadas por *S. mutans*, de 12 a 30 meses, pertencentes a creches públicas no interior de São Paulo. A genotipagem dos isolados foi feita por AP-

PCR e análise de polimorfismos por enzima de restrição (HaeIII). A diversidade genética de *S. mutans* foi grande nas crianças altamente expostas ao microrganismo, e os autores mostraram o primeiro relato na literatura de duas crianças atendidas na mesma creche, sem relação familiar, porém com genótipos coincidentes sugerindo transmissão horizontal.

TEDJOSASONGKO & KOZAI (2002) estudaram 39 crianças de dois a 25 meses de idade, em creches no Japão. As crianças eram atendidas 10 horas por dia, cinco vezes por semana. Técnicas moleculares com EcoRI e HaeIII determinaram os *fingerprintings* das amostras de *S. mutans* para comparações de similaridade, através de análise visual e densitometria. Os autores observaram seis crianças das creches com padrões idênticos de similaridade de *S. mutans*, sugerindo transmissão entre elas, porém nenhum cuidador da creche apresentou similaridade das cepas de *S. mutans* com qualquer cepa das crianças analisadas. Oitenta e dois por cento das crianças apresentaram apenas um único genótipo de *S. mutans*.

KLEIN *et al.* (2004) monitorando 16 pares mães/bebês pela reação em cadeia da polimerase com dois *primers* arbitrários (OPA-02 e OPA-13) durante 20 meses bimensalmente, observaram variações de um a quatro tipos clonais de *S. mutans* para os bebês na época da aquisição, porém a maior parte da amostra abrigou um único clone. Não foi observada associação entre o número de genótipos encontrados nas crianças e o número de dentes erupcionados. A transmissão vertical de *S. mutans* ocorreu em 13 (81,25%) dos 16 pares avaliados. Durante a aquisição inicial ou no acompanhamento de 20 meses, de um a três amplitipos de *S. mutans* foram transmitidos das mães para as crianças. Muitas crianças apresentaram genótipos que não eram de origem materna, porém os autores não encontraram bebês de mesmo ambiente das creches compartilhando estes genótipos.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral do presente estudo foi identificar, através de estudo prospectivo, a fase de aquisição inicial de *Streptococcus mutans* em crianças que freqüentam creches públicas de Piracicaba (São Paulo), identificando as vias não familiares de transmissão destes microrganismos. Para tanto os objetivos específicos deste estudo foram:

3. 1 Determinar, através de estudo prospectivo o momento da aquisição inicial de *Streptococcus mutans* em uma população infantil com idade inicial entre 5 e 13 meses, em creches públicas da cidade de Piracicaba (São Paulo), avaliando as variações nos níveis de infecção durante 18 meses;

3. 2 Avaliar a similaridade dos padrões genotípicos de isolados de SM entre as crianças que freqüentavam as mesmas creches, e destas crianças e suas respectivas auxiliares de saúde (cuidadores).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População estudada

Participaram deste estudo prospectivo todas as crianças (160) que ingressaram nos berçários I e II das 28 creches públicas (Escolas Municipais de Educação Infantil – EMEIs) da cidade de Piracicaba (São Paulo), durante os meses de maio a agosto do ano de 2003. Com idade inicial entre 5 e 13 meses ($9,6 \pm 2,4$), a população foi composta por 85 meninos e 75 meninas.

Foram incluídas na pesquisa, além das crianças, noventa e uma auxiliares de saúde, atendentes de 28 EMEIS para rastrear fontes alternativas de transmissão de *S. mutans* nos respectivos berçários. Dentre estas, 61 auxiliares de saúde de 23 EMEIs, as quais atendiam 67 bebês, apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans*, e tiveram os isolados testados após os exames microbiológicos. Como controle, incluíram-se também nos exames microbiológicos, 16 mães de um subgrupo de 17 crianças infectadas durante o estudo e com altos níveis de *S. mutans* em pelo menos duas amostras consecutivas.

Para participar deste estudo, as mães das crianças foram instruídas sobre os objetivos e métodos do trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice 1) autorizando a participação de seus filhos, como previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (CEP- FOP/UNICAMP; Proc. 110/2002) (anexo 1). Da mesma forma, as auxiliares de saúde e mães incluídas no estudo também assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

As crianças freqüentavam as creches cinco dias por semana, permanecendo em média dez horas diárias e onde recebiam dieta contendo quatro refeições diárias ricas em sacarose. A população da cidade consome água fluoretada desde 1971 (aproximadamente 0,7 ppm). Nestas EMEIs, as auxiliares de saúde realizam a higiene corporal dos bebês, porém os dentes/rodetes são

higienizados apenas a partir dos dois anos de idade. As crianças recebem medicamentos como vitaminas e antibióticos, somente quando solicitado pelos responsáveis. Todas as mães receberam um questionário (apêndice 2) com o objetivo de conhecer os hábitos de sucção de chupeta/digital, higiene bucal, alimentação, utilização de fluoretos e saúde geral da criança, além informar o grau de escolaridade e *status* sócio-econômico familiar. Os questionários foram respondidos no início do estudo, sendo recolhidos em seguida pela agente de saúde responsável por cada creche.

4. 2 Delineamento do estudo prospectivo

As crianças foram visitadas para exames clínicos e coletas de saliva por quatro vezes durante o estudo prospectivo, em intervalos de seis meses, sendo acompanhadas por dezoito meses nos respectivos tempos: T0, T6, T12 e T18. A Figura 1 ilustra o delineamento do estudo prospectivo e os procedimentos realizados em cada fase. O estudo foi iniciado com 160 crianças. Ao final (T18), um total de 119 crianças se manteve no estudo, sendo que 41 (25,6%) não permaneceram porque haviam se mudado da região ou da creche. Para os cuidadores e mães, somente foi realizada a coleta de saliva, sendo a mesma feita em um único momento do estudo. A identidade genotípica dos isolados de *S. mutans* dos grupos de cuidadores e mães foram realizados como descrito para os isolados dos bebês.

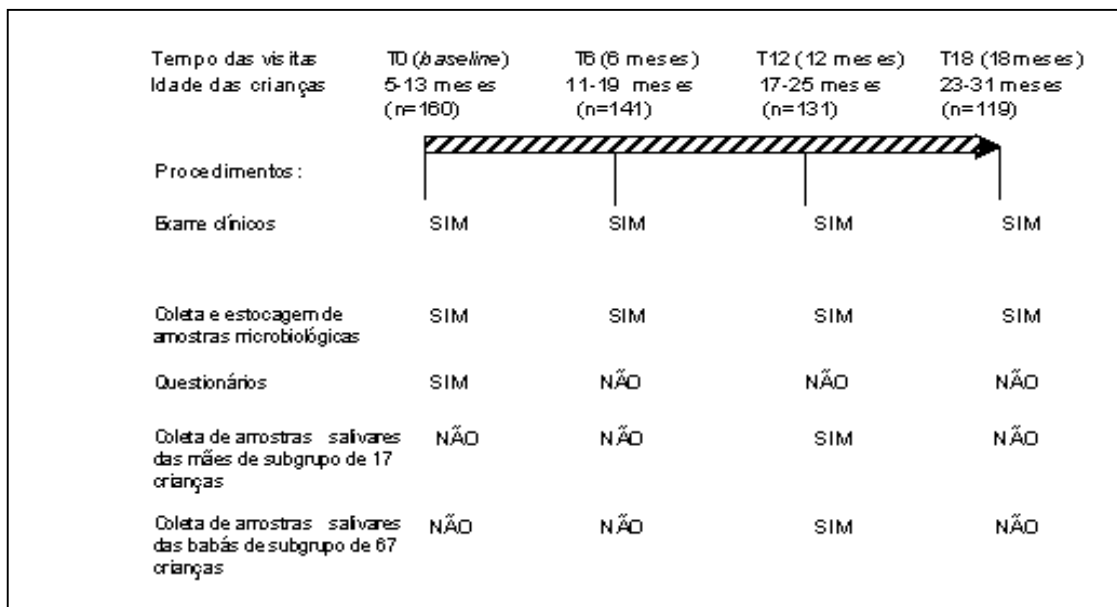


Figura 1. Delineamento do estudo prospectivo, iniciado com uma amostra de 160 crianças na faixa etária de 5 a 13 meses, as quais freqüentam 28 EMEIs da cidade de Piracicaba, São Paulo. Estas crianças foram acompanhadas durante 18 meses, até apresentarem uma idade entre 23 e 31 meses. Em todas as fases, as crianças foram examinadas clinicamente. Os exames, amostras bucais e salivares foram coletados, para a análise da colonização bucal por *S. mutans*. Um outro subgrupo de 17 crianças teve as mães avaliadas quantos aos níveis bucais de *S. mutans* e diversidade genotípica. Um total de 66 cuidadores de 67 crianças foram também submetidas às mesmas análises de níveis de infecção e diversidade genotípica de *S. mutans*.

4.3 Coleta das amostras de saliva para exame microbiológico

As amostras de saliva das crianças foram coletadas com auxílio de espátulas de madeira esterilizadas. A espátula era inserida gentilmente na boca do bebê, umedecida com saliva e pressionada de ambos os lados contra o dorso da língua. Após removida da cavidade bucal, ambas as faces da espátula eram pressionadas no meio de cultura ágar Mitis-Salivarius (Difco Lab., Detroit, EUA), adicionado de 15% de sacarose (Sigma), 0,2 U de bacitracina (Sigma)/mL e telurito de potássio a 1% - MSB (GOLD *et al.*, 1973), em placa Rodac® (KÖHLER

& BRATTHALL, 1979) (Figura 2). As placas eram fechadas, identificadas com o número da criança, vedadas com fita crepe e colocadas em grupos de quatro em um saco plástico contendo ar expirado e levadas para o laboratório de microbiologia da FOP-UNICAMP em um período máximo de 2 horas para serem incubadas.

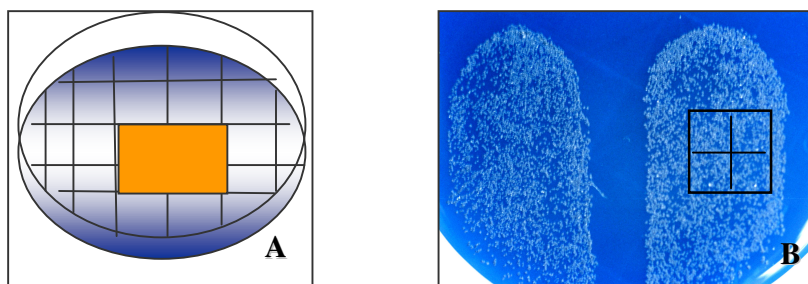


Figura 2. (A) Representação esquemática da placa Rodac[®] contendo meio de cultura (A). Placa contendo crescimento de *S. mutans* após 48 horas, observada em lupa estereoscópica com aumento de 8 vezes, e desenho esquemático da área da contagem (B).

Para as coletas de saliva das auxiliares de saúde e mães, estas eram instruídas a estar em jejum ao menos uma hora antes da coleta e não ter utilizado antibióticos nas últimas duas semanas. Um pedaço de parafina (Parafilm[®]; 4 x 2 cm) era entregue às auxiliares para que mastigassem durante um minuto, desprezando-se esta primeira amostra de saliva estimulada. Em um segundo momento, após novo estímulo, uma espátula de madeira esterilizada era inserida na cavidade bucal sendo contaminada com um *pool* de saliva e pressionada as duas faces contra a placa Rodac[®] contendo meio MSB. As placas eram identificadas e vedadas, inseridas imediatamente em sacos plásticos contendo ar expirado e transportadas ao laboratório da FOP/UNICAMP num período máximo de duas horas para serem incubadas.

4. 4 Exames clínicos intra-bucais

Os exames intrabucais foram realizados com as crianças na posição deitada no trocador, com auxílio de espelho clínico intrabucal n. 3 (Duflex) e sob luz artificial (lâmpada portátil) após limpeza e secagem com gaze. Para isto, os dentes e rodets gengivais eram higienizados com gaze e água filtrada e, havendo a presença molares, era utilizada uma escova dental infantil de cerdas macias, fornecida pela pesquisadora. Quando da presença de contatos das superfícies dentárias proximais, utilizou-se fio dental.

Os exames foram realizados preferencialmente antes da alimentação da criança. Os dentes, quando presentes, eram examinados apenas visualmente para detecção de lesões de cárie. O número de dentes erupcionados e a presença de lesões de cárie eram anotadas numa ficha clínica, previamente elaborada (apêndice 3).

Um dente foi considerado erupcionado quando qualquer parte da sua coroa estivesse erupcionada na cavidade bucal (OMS, 1997). O número de dentes cariados, perdidos e obturados foi expresso como ceo-s. Como critérios para a realização do exame clínico, optou-se pela distinção das lesões iniciais tipo manchas brancas daquelas já cavitadas.

Lesões iniciais foram definidas como desmineralizações que resultam em alterações na opacidade/translucência do esmalte das superfícies dentárias (lesões opacas de manchas brancas associadas a locais de estagnação do biofilme e/ou evidências de inflamação gengival). Lesões cavitadas foram consideradas como aquelas em que uma lesão de fóssula ou fissura ou de superfície lisa apresentasse uma cavidade evidente, esmalte socavado, ou um amolecimento detectável do assoalho ou paredes (OMS, 1997). Em caso de dúvidas, não se registrou a presença da doença (OMS, 1997). Opacidades de origem diversas que não em decorrência de lesões de cárie foram desconsideradas. O explorador não foi utilizado neste exame.

Todos os procedimentos foram realizados por único examinador, A.C.Alves, aluna do Curso de Doutorado em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP, o qual foi auxiliado por outro cirurgião dentista (R.D. Nogueira). A examinadora foi calibrada em duas etapas do estudo, sendo os índices de concordância intra-examinador determinados. Para isto, a concordância intra-examinador para o diagnóstico das lesões de cárie foi testada através do exame de outros 20 bebês em condições iguais às aquelas da pesquisa, por duas vezes em intervalos de pelo menos uma semana. O índice de concordância *kappa* entre os dois exames foi calculado, e demonstrou valor aceitável (Coeficiente *kappa* > 0,86; $p < 0,05$).

As agentes de saúde das creches e as mães responsáveis pelas crianças foram informadas sobre a presença de lesões de cárie. As crianças com lesões cavitadas foram encaminhadas para o atendimento especializado no Centro de Atendimento de Pacientes Especiais (CEPAE), da FOP-UNICAMP, como determinado no processo de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FOP/UNICAMP-proc. 110/2002). As despesas de transporte das mães e crianças que compareceram ao CEPAE foram custeadas através do projeto (FAPESP, proc. 02/07156-1), com o fornecimento de passes de ônibus para os comparecimentos às consultas. As mães atendidas assistiram palestras a respeito da saúde bucal do bebê e receberam instruções para a prevenção de problemas bucais onde se abordou hábitos sobre higiene bucal, dieta, importância da amamentação e efeitos prejudiciais do uso prolongado de chupeta e mamadeira. Esta orientação foi realizada por alunos de pós-graduação e estagiários da clínica de bebês do CEPAE, sob supervisão da Profa. Dra. Rosana Possobon. As crianças atendidas com lesões cavitadas de cárie receberam restaurações com cimento de ionômero de vidro, após curetagem superficial da lesão (restauração atraumática).

4. 5 Isolamento, cultivo e estocagem dos isolados de *Streptococcus mutans*

As placas Rodac[®] contendo MSB foram incubadas em estufa a 37°C em microaerofilia (chama de vela) por 48 horas, e observadas sob lupa estereoscópica (Carl-Zeiss[®]) em aumento de 8 vezes. Se nenhum crescimento de *S. mutans* fosse observado, a placa era incubada por mais 24 horas.

Uma área de aproximadamente 2,25 cm² era determinada em cada marca da espátula, para que as colônias com morfologias típicas de *S. mutans* fossem contadas e registradas. Oito unidades formadoras de colônias (UFC), com características típicas de *S. mutans* de cada criança, cuidadores ou mães foram aleatoriamente selecionadas, e repicadas com alça de platina estéril em placa de Petri[®] contendo ágar Mitis-Salivarius, sem adição de sacarose ou bacitracina (MSA). As placas foram incubadas a 37°C, em estufa com 10% de CO₂, por 24 h. Colônias foram coletadas e estocadas em tubos tipo *eppendorfs* esterilizados contendo 1mL de *skim milk* a 10% estéril (DIFCO), em duplicata, em uma temperatura de – 20°C. Caso as culturas em MSA não estivessem puras, era feito novo re-isolamento como descrito.

4. 6 Extração e purificação do DNA genômico dos isolados de *S. mutans*

Para obtenção do DNA genômico bacteriano, os 1392 isolados de *S. mutans* (819 isolados das crianças, 448 isolados das auxiliares de saúde e 125 isolados das mães) conservados em *Skim milk* a -20°C, foram reativados em placas de Petri[®] contendo meio não seletivo *Todd Hewitt Agar* (THA) e incubados à 37°C por 24 horas, em estufa com 10% de CO₂. Dois a quatro clones típicos de cada cultura foram selecionados para crescerem em 3 mL de caldo *Todd Hewitt* (THB), em condições similares às anteriores, por 18 horas. Após o crescimento

bacteriano, 1,5 mL das culturas foram centrifugados por 10 minutos a 13.000xg, os sobrenadantes descartados e os *pellets* estocados a – 20°C para posterior extração de DNA genômico. Para a extração e purificação do DNA dos isolados foi utilizado o *kit* de purificação de DNA–MasterPure® (EPICENTRE Technologies, Madison, Wis.–EPIC-MCD85201), seguindo-se as orientações do fabricante. Resumidamente, foram acrescidos 300ul de tampão de lise celular com 2ul de proteinase K (50µg/µL) aos *pellets* e homogeneizados para re-suspensão. As amostras foram incubadas à 65°C por 15 minutos e resfriadas em seguida em gelo para adição de 2µL de enzima Rnase (5 µg/µL). Para a precipitação do DNA total, foram acrescidos 150µL de reagente de precipitação de proteína a 300µL da amostra lisada, sendo os debris precipitados por centrifugação a 10000x rpm. e descartados. Os sobrenadantes contendo o DNA foram acrescidos a 500µL de isopropanol até observar-se algum precipitado. Em seguida foram lavados duas vezes com 150µL de etanol a 70% (gelado), aguardando a secagem por um tempo aproximado de duas horas. Os DNAs secos foram dissolvidos em 32µL de tampão Tris-EDTA pH 8,0 (TE) e acondicionados a 4°C por algumas horas. O total de 3ul da cada amostra de DNA genômico dissolvido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% por uma hora, para verificar as condições de integridade e pureza. Para tanto, os géis foram corados por dez minutos com brometo de etídio a 0,5ug/mL (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil), e as bandas de DNA analisadas sob luz ultra violeta (Transiluminador Pharmacia LKB - Macro Vue) (Figura 3). As amostras de DNA foram conservadas a – 20°C, para utilização posterior nos ensaios de AP-PCR.

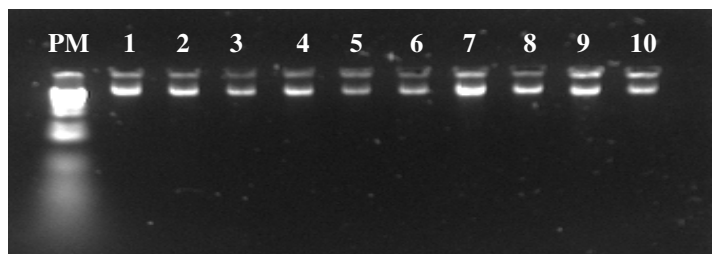


Figura 3. Gel de agarose a 1% para monitoramento da integridade das amostras de DNA genômico. PM: Peso molecular de 1Kb; canaletas 1 a 10: amostras de DNA genômicos dos isolados de *S. mutans* dos bebês.

4. 7 Determinação do padrão genético dos isolados clínicos de *S. mutans* por AP-PCR (Reação em cadeia da polimerase com primer arbitrário).

Para a determinação dos padrões genotípicos das cepas de *S. mutans* isoladas foi utilizado o *primer* arbitrário OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3') – *primer* com melhor poder discriminatório de *S. mutans*, segundo LI & CAUFIELD (1998). As reações foram processadas em volumes de 50µl contendo aproximadamente 10ng de DNA purificado em uma mistura de: 0,8mM de dNTPs, 3,5mM de MgCl₂, 1,25U de *taq* DNA-polimerase, em tampão de Tris-HCl (20mM) e KCl (50mM) em pH 8.4 (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). A mistura reagente foi submetida à ciclagem térmica em aparelho termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) consistindo de desnaturação inicial a 95°C por 2 min., seguida de 45 ciclos com desnaturação a 94°C (30s), anelamento a 36°C (30s) e extensão a 72°C (1min), concluindo com extensão final a 72°C (5 min.).

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram conservados a – 20°C ou analisados no mesmo momento por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão Tris-Borato-EDTA em pH 8,0 (TBE 0.5X, 3v/cm por 3 h). Em cada gel, foi incluído um padrão de peso molecular de 250 pb (DNA ladder; INVITROGEN® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada

corrida, o gel foi corado com brometo de etídio a 0,5 µL/mL (INVITROGEN® - Life Technology do Brasil) por dez minutos. As imagens visualizadas por sistema Image Master (Pharmacia Biotech) foram capturadas digitalizadas pelo LISCAP – programa computacional (Figura 4) e salvas como “Tagged Image File Format” (TIFF) para comparações visuais e perfis de similaridade.



Figura 4. Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Os ensaios de AP-PCR dos isolados de *S. mutans* dos bebês das mesmas creches, das cuidadores e mãe-filho(a) foram processadas na mesma reação e os produtos resultantes separados no mesmo gel, lado a lado, visando aumentar a acuracidade das comparações visuais. Em todas as baterias de AP-PCR foi incluído também o DNA genômico da cepa padrão *S. mutans* UA130 (gentilmente cedida pelo Dr. Page A. Caufield, do Departamento de Biologia Oral da Universidade de Nova Iorque, Nova Iorque, E.U.A). Como controle negativo, o DNA genômico foi substituído por água Milli-Q esterilizada.

Os perfis de amplificação observados foram considerados similares ou iguais quando a maior parte das bandas eram idênticas (padrões $\geq 99\%$ das bandas iguais), ao serem analisadas visualmente por um único examinador

(A.C.Alves). Qualquer diferença envolvendo bandas majoritárias foi considerada discriminatória. Visando assegurar reprodutibilidade, algumas reações de AP-PCR foram realizadas pelo menos duas vezes de modo independente, utilizando preparações diferentes de DNA. Para os isolados com amplitipos de padrões muito semelhantes ou iguais, novas reações de AP-PCR foram realizadas com o mesmo *primer*, OPA-02. Reações adicionais com o *primer* OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') também foram utilizadas para a confirmação da similaridade entre tais amplitipos.

4. 8 Construção das matrizes de similaridade e dendrogramas

Para cálculo dos índices de similaridade dos amplitipos considerados visualmente como iguais, ou muito semelhantes entre crianças distintas, foram construídas matrizes de similaridade dos isolados destas crianças. Como controle, todos os bebês destas mesmas creches foram incluídos nestas matrizes. Estas matrizes foram utilizadas para o cálculo do coeficiente *Dice* de similaridade, sendo que os padrões de AP-PCR (amplitipos) foram considerados como idênticos quando o coeficiente *Dice* foi igual ou superior a 0,95 (LI & CAUFIELD, 1998; LY *et al.*, 2001). Estes índices de similaridade foram determinados após análises de agrupamento dos géis com algoritmo de agrupamento UPGMA (unweight pair-group method with mathematics average), para construção dos dendrogramas. Assim, as bandas representativas do fragmento do DNA amplificado são comparadas e as cepas agrupadas em *clusters*.

As análises de similaridade foram realizadas com auxílio do *software* "Fingerprinting II informatix", TM software, versão 3.0 da Bio-Rad, pela Dra. Yihong Li, do Departamento de Ciência Básica e Biologia Crânio-Facial da Universidade de Nova Iorque, Nova Iorque (E.U.A.).

4. 9 *Análise dos Resultados*

Após a tabulação dos dados realizou-se estatística descritiva e analítica.

As comparações da distribuição de crianças segundo o desenvolvimento de lesões de cárie, idade, níveis de infecção por *S. mutans*, número de amplitipos de *S. mutans* foram comparadas através do teste de Qui-quadrado (valor corrigido de *Yates*) ou teste exato de *Fisher*. A idade, número de dentes erupcionados, e índices de cárie foram comparados entre crianças classificadas segundo os níveis de *S. mutans*, através do teste de variância não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* ou de *Mann-Whitney*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p=0,05$).

5. RESULTADOS

5. 1 *Características clínicas e microbiológicas das crianças acompanhadas durante as fases de T0 a T18.*

Das 160 crianças que iniciaram a pesquisa em T0, 119 bebês entre 23 e 33 meses de idade permaneceram no estudo até T18 (60 meninas e 59 meninos), havendo uma evasão de 25,6% da amostra. Os dados de prevalência de cárie durante as fases do estudo longitudinal são mostrados na Tabela 1. As primeiras lesões cavitadas de cárie dental foram detectadas precocemente na fase T0. A prevalência de cárie aumentou durante o estudo, atingindo maior valor (19,3%) em T18. A idade média das crianças com cavidades em T18 foi de 28,3 meses ($\pm 2,9$). Estas lesões estavam presentes tanto na superfície oclusal de molares (47,5%), quanto nas superfícies vestibulares e palatinas de incisivos superiores (52,5%), envolvendo apenas esmalte ou, esmalte e dentina, entretanto nenhuma lesão apresentava envolvimento pulpar. As lesões cavitadas foram mais prevalentes no grupo de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans*, sendo observadas especialmente entre T12 e T18, quando o número de crianças com lesões de cárie foi significativamente maior entre as crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* em comparação àquelas em que *S. mutans* não foram detectados (Tabela 1). As lesões em estágio inicial, diagnosticadas clinicamente como manchas brancas ativas, (mba) foram identificadas a partir de T0. A prevalência de manchas brancas em T12 e T18 foram 24,4 e 27,7%, respectivamente. A porcentagem de crianças livres de cárie em T18 foi 63,9% (76 de 119 crianças).

Em T0, 51 (31,8%) crianças não apresentavam nenhum dente irrompido. Níveis detectáveis de *S. mutans* foram observados em 5,6% (n=9) das crianças estudadas nesta fase, os quais variaram de 1 a ≥ 100 ufc/área, sendo verificados mesmo em bebês edêntulos*. Seis das 9 crianças positivas para *S. mutans* apresentavam apenas dentes incisivos na cavidade bucal (de 1 a 5

* dois bebês edêntulos apresentaram-se positivos para *S. mutans* em T0.

dentes) e uma criança já apresentava os quatro primeiros molares decíduos. A distribuição das crianças segundo a detecção de *S. mutans* e presença de lesões de cárie em cada fase do estudo é mostrada na Tabela 1. Observou-se a partir de T12 que a prevalência de cárie foi significativamente maior entre crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* em relação às crianças não detectavelmente infectadas (Teste de Fischer, $p < 0,01$). Estas diferenças foram pouco afetadas pelos números de dentes irrompidos e idade uma vez que, em cada fase do estudo, não houve diferença estatisticamente significante entre as médias de idade e dentes irrompidos entre crianças infectadas ou não por *S. mutans*, exceto quando os números de dentes foram comparados na fase T6. Em T12, 95,2% das crianças infectadas apresentaram os quatro primeiros molares decíduos irrompidos na cavidade bucal. Neste momento, a média foi de 15 dentes irrompidos para as 131 crianças acompanhadas, onde mais de 30% destas apresentaram-se infectadas por *S. mutans*. Em T18, 100% da amostra apresentou os quatro primeiros molares decíduos completamente irrompidos. Neste momento, das 48 (40,3%) crianças infectadas, 39 (81,3%) já contavam com a presença de ao menos um segundo molar decíduo.

Com relação à idade inicial da detecção de *S. mutans*, estes microrganismos foram detectados em crianças a partir de seis a treze meses, na primeira fase do estudo (T0). Por outro lado, 6 (66,7%) das 9 crianças *S. mutans*-positivas em T0 não demonstraram níveis detectáveis de *S. mutans* na avaliação subsequente, seis meses após (T6). A média de idade da detecção inicial em T0 foi de 9,6 ($\pm 2,2$) meses (Tabela 1). Houve um acréscimo considerável ao percentual de crianças com *S. mutans* detectáveis durante o acompanhamento em função do aumento da idade. As idades mínima e máxima da detecção inicial de *S. mutans* foram de 8 e 32 meses de idade respectivamente durante todo estudo ($n=60$). Porém a maior parte dos bebês ($n=36$; 60%) adquiriu *S. mutans* entre 17 e 22 meses de idade, correspondendo exatamente às fases T6 e T12 (média $\pm$ dp: $18,1 \pm 3,3$). A idade mediana de detecção inicial de *S. mutans* foi de 21 meses. Das 119 crianças acompanhadas durante os dezoito meses, 63 (52,9%)

permaneceram com níveis não detectáveis de *S. mutans* até a fase final do estudo (T18), sendo que três apresentaram níveis detectáveis em uma única fase, T0, porém baixos níveis foram observados (1 a 7 ufc/área).

Tabela 1 - Distribuição das crianças examinadas nos períodos T0, T6, T12 e T18 quanto à detecção de *S. mutans*, prevalência de crianças com cavidades de cárie, idade (meses) e número de dentes irrompidos.

Níveis salivares de <i>S. mutans</i>	Número de crianças (%)		Idade (meses) ^a	N ^o de dentes
	total	com cavidades de cárie	média (±dp)	Média (±dp)
<i>Fase T0</i>				
Não detectáveis	151 (94,4)	- (0)	9,6 (± 2,4)	3,5 (± 3,3)
Detectáveis (≥1 ufc)	9 (5,6)	1 (100,0)	9,6 (± 2,2)	3,8 (± 4,2)
Total	160 (100,0)	1 (100,0)	9,6 (± 2,4)	3,5 (± 3,4)*
<i>Fase T6</i>				
Não detectáveis	119 (84,4)	1 (50,0)	15,6 (± 2,7)	9,4 (± 4,5)
Detectáveis (≥1 ufc)	22 (15,6)	1 (50,0)	17,7 (± 2,3)	12,5 (± 3,8) ^b
Total	141 (100,0)	2 (100,0)	16,0 (± 2,8)	10,0 (± 4,5)
<i>Fase T12</i>				
Não detectáveis	89 (67,9)	1 (6,25)	21,8 (± 2,9)	14,9 (± 3,1)
Detectáveis (≥1 ufc)	42 (32,1)	15 (93,75) ^c	22,6 (± 2,7)	16,0 (± 2,7)
Total	131 (100)	16 (100,0)	22,2 (± 2,9)	15,3 (± 3,1)
<i>Fase T18</i>				
Não detectáveis	71 (59,7)	1 (4,2)	28,3 (±2,9)	18,1 (±2,9)
Detectáveis (≥1 ufc)	48 (40,3)	23 (95,8) ^c	28,3 (±2,9)	18,6 (±1,8)
Total	119 (100,0)	24 (100,0)	28,3 (±3,0)	18,3 (±2,0)

* Média de todas as crianças, incluindo as 51 sem dentes; Para o grupo das 109 crianças com pelo menos 1 dente irrompido: 5,0 (±2,9); Comparações dos idades médias ou números de dentes irrompidos entre crianças com e sem níveis detectáveis de *S. mutans*:

a Mann-Whitney: $p>0,05$

b Mann-Whitney: $p<0,01$

Análise da distribuição de crianças segundo a detecção de *S. mutans* e presença de lesões de cárie:

c Teste de Fisher: $p<0,01$

Flutuações nos níveis bucais de *S. mutans* foram observadas entre os períodos T0 e T18. As freqüências de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* nas fases iniciais do estudo, as quais mantiveram níveis detectáveis de *S. mutans* em visitas subseqüentes são demonstrados na Tabela 2. As porcentagens de crianças com altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc; Figura 5) aumentaram durante o estudo, sendo observados que 16% das crianças apresentaram altos níveis de infecção em T18. A Figura 6 ilustra as variações nos níveis de *S. mutans* da amostra nas diferentes fases do estudo (de T0 a T18).

Tabela 2 – Freqüência de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* (≥ 1 ufc) em uma ou mais visitas subseqüentes à primeira fase de detecção de *S. mutans*.

Crianças com ≥ 1 ufc de <i>S. mutans</i> nas diferentes fases do estudo	Nº (%) de crianças com níveis detectáveis de <i>S. mutans</i> nas fases subseqüentes à primeira detecção		
Prospectivo	T6	T12	T18
T0 (n=9)	3 (33,4)	3 (33,4)	2 (22,2)*
T6 (n=22)	-	14 (66,6)**	9 (40,9) ^β
T12 (n=42)	-	-	33 (78,6) [†]

* Uma criança *S. mutans*-detectável não permaneceu no estudo em T18; ** Três crianças saíram do estudo em T12; ^β seis crianças deixaram o estudo da fase T6 para T18; [†] cinco crianças deixaram o estudo da fase T12 para fase T18.

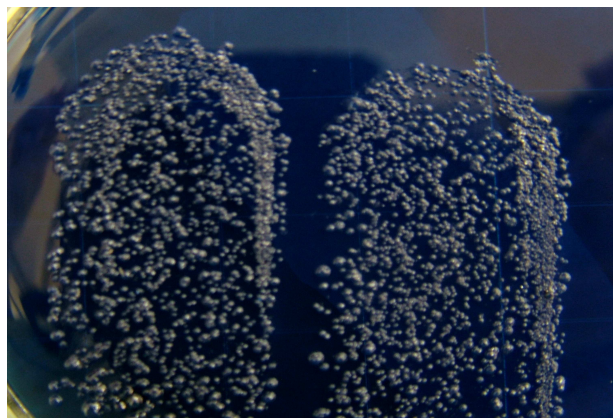


Figura 5. Placa Rodac® de bebê *mutansmilionário* ($\geq 100\text{ufc}/\text{área}$), após 48 horas de incubação.

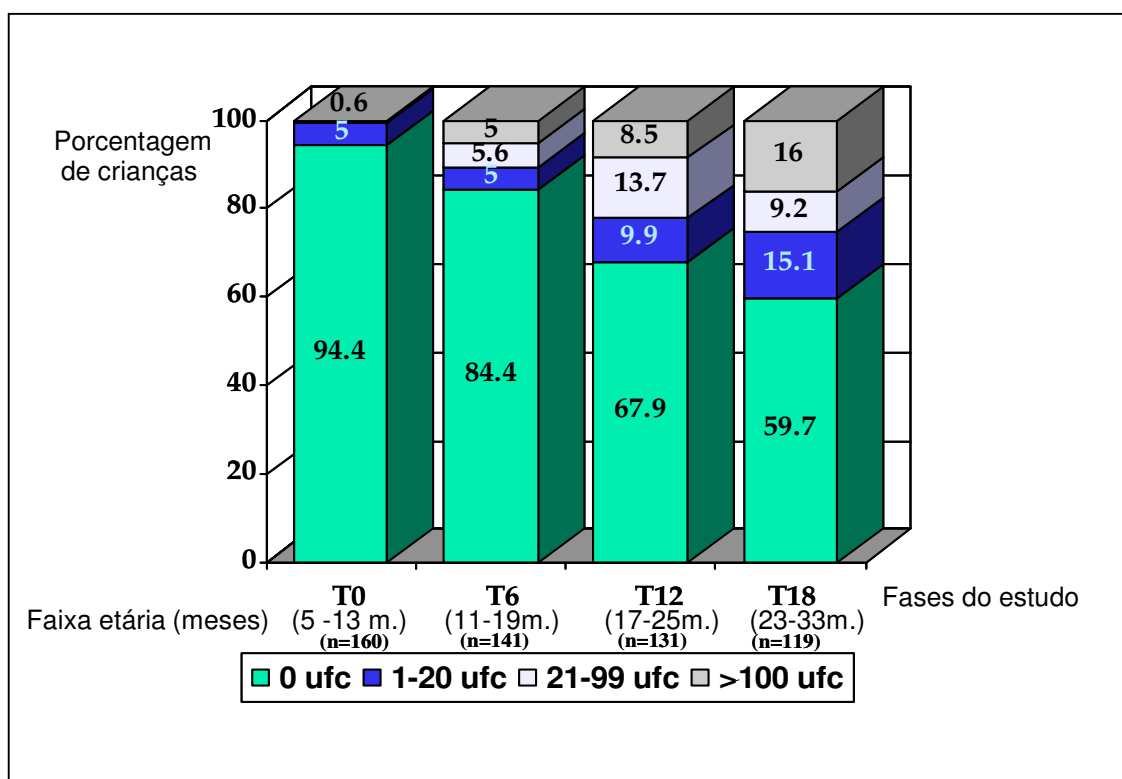


Figura 6. Flutuações nos níveis bucais de *S. mutans* (ufc), durante as fases T0 (n=160), T6 (n=141), T12 (n=131) e T18 (n=119) do estudo prospectivo.

5.2 Fatores sócio-econômicos e hábitos de aleitamento e amamentação

Dos 160 questionários distribuídos às agentes de saúde para serem entregues às mães nas creches, cem (62,5%) responderam aos mesmos, sendo os dados tabulados e analisados com auxílio do programa EPI-INFO 6.04. As famílias analisadas nos 100 questionários apresentavam uma renda familiar média de 2,7 ($\pm 4,8$) salários mínimos (variando de 0,3 a 20,8 salários). O total de 46% das mães das crianças incluídas no estudo relatou grau de escolaridade inferior ao 2º grau completo, sendo que 48% apresentavam pelo menos o 2º grau completo. Seis (13,4%) destas apresentavam nível de escolaridade superior. Seis mães não responderam às questões sobre renda familiar e/ou grau de escolaridade.

As questões sobre duração do aleitamento materno foram respondidas pelas 100 mães. Entre estas, observou-se que 32% das mães nunca amamentaram as crianças ou que a amamentação durou no máximo três meses. A amamentação materna foi realizada dos quatro aos 12 meses nas crianças em 69% (n=69) dos casos e 6% (n=6) das crianças foram amamentadas por pelo menos 12 meses. O total de seis mães dentre as nove cujas crianças apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans* em T0, responderam ao questionário. Dentre estas nove crianças, a duração da amamentação materna variou de 3 a 9 meses (mediana: 4,5 meses). A Tabela 3 mostra a distribuição das 18 crianças infectadas por *S. mutans* entre T0 e T6, segundo a duração a amamentação materna.

Sessenta e duas crianças entre 5 e 20 meses de idade ainda utilizavam chupeta. A duração da utilização de mamadeira noturna variou de 5 a 13 meses. Um total de 78 (78%) crianças ainda utilizavam a mamadeira noturna na época das entrevistas (T0 a T6). Entre as crianças que usavam mamadeira noturna (n=78), 42,8% (n=33) utilizavam bebidas sem sacarose ou apenas leite puro, enquanto que 57,2% acrescentavam sacarose à mamadeira e/ou componentes

“espessantes”, como por exemplo, amido de milho, farelos de trigo ou aveia. A Tabela 4 mostra a relação entre o consumo de sacarose em mamadeiras noturnas e a detecção de *S. mutans* durante as fases T0 a T6. A diferença entre o número de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* nos grupos que utilizavam sacarose ou não na mamadeira noturna foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Distribuição das crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* entre T0 e T6 segundo a duração da amamentação materna (n=100).

Níveis detectáveis de <i>S. mutans</i>	N ^o .(%) de crianças com duração da amamentação materna de:	
	0 – 5 meses	> 5 meses
Sim (≥ 1 ufc)	8 (44,5%)	10 (55,5%)
Não (0 ufc)	41 (50%)	41 (50%)
Total	49 (49%)	51 (51%)

* Análise da distribuição de crianças segundo a detecção de *S. mutans* e o tempo de amamentação materna: χ^2 : 9,07; $p=0,1$.

Tabela 4 - Distribuição das crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* entre T0 e T6 segundo a presença de sacarose na mamadeira noturna.

Níveis detectáveis de <i>S. mutans</i>	N ^o .(%) de crianças com uso de mamadeira noturna:	
	sem sacarose	com sacarose
Sim (≥ 1 ufc)	4 (12,1%)	11 (25,0%)*
Não (0 ufc)	29 (87,9%)	33 (75,0%)
Total	33 (100,0%)	44 (100,0%)

* Análise da distribuição de crianças segundo a detecção de *S. mutans* e o uso da sacarose na mamadeira noturna: χ^2 : 5,07; $p=0,024$.

5.3 Padrão de colonização inicial das crianças por amplitipos de *S. mutans*.

Um total de 25 cepas de *S. mutans* foi isolado durante a fase T0. Na fase T6, 162 isolados de *S. mutans* foram obtidos e nas fases T12 e T18, 287 e 345 cepas foram isoladas, respectivamente. A técnica de AP-PCR com *primer* OPA-02 foi utilizada para analisar a diversidade genética existente entre os 819 isolados de *S. mutans*. A Figura 7 ilustra um gel representativo dos ensaios de AP-PCR para determinação dos amplitipos .

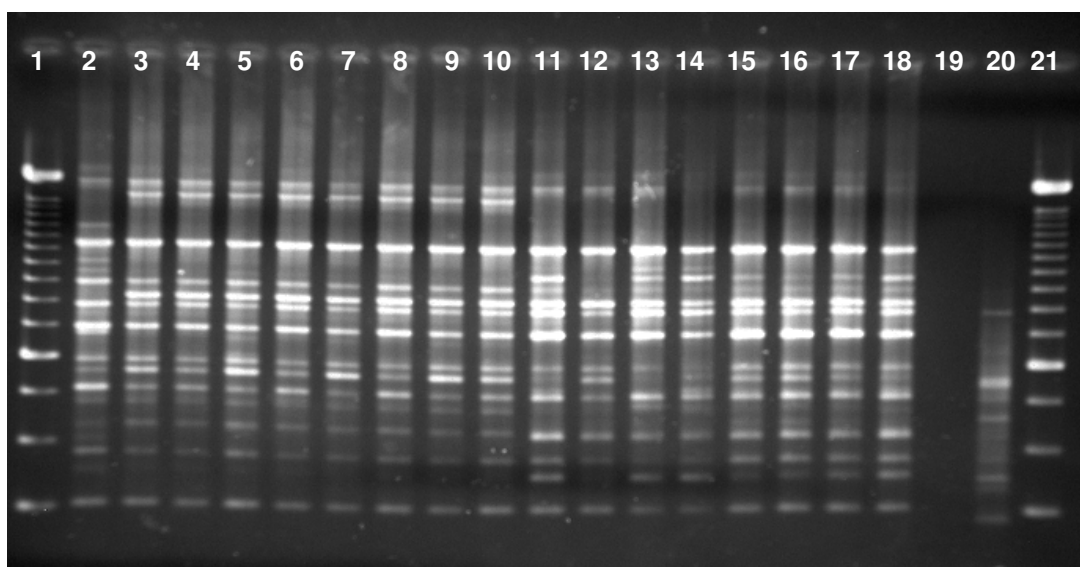


Figura 7. Padrões de AP-PCR obtidos de 16 cepas de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de bebês. Canaletas 1 e 21: padrão de peso molecular de 250 pares de bases; Canaleta 2: cepa *S. mutans* padrão UA 130; Canaleta 20: controle negativo – água *milli-Q*; Canaletas 3 a 18: exemplificando 16 isolados clínicos de *S. mutans* dos bebês.

A Tabela 5 mostra o número de crianças com um ou mais amplitipos distintos de *S. mutans* nas quatro fases do estudo T0, T6, T12 e T18. Durante a identificação genotípica dos isolados das crianças, observou-se uma prevalência maior de crianças abrigando um único amplitipo, em todas as fases do estudo. Na fase T18, dentre os 48 bebês com *S. mutans* detectáveis, 75% (n=36)

apresentavam um único amplitipo. O número de amplitipos por bebês variou entre um e quatro, não sendo observada associação entre os níveis detectáveis de *S. mutans* e a diversidade genotípica dos bebês. O mesmo pôde ser registrado com relação à idade. O re-isolamento de amplitipos identificados inicialmente na cavidade bucal durante o acompanhamento de seis a dezoito meses é mostrado na Tabela 6. Observou-se que 87,5% (n=7) dos amplitipos identificados em T0 (n=8) não foram re-isolados após 6 meses (T6). Entretanto, um amplitipo isolado em fase precoce (T0) permaneceu na cavidade bucal até a fase T12, embora não tenha sido detectado em T18. Entre as crianças infectadas no *baseline*, 50, 83,4 e 83,4% não apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans* em T6, T12 e T18, respectivamente. Flutuações na colonização por amplitipos de *S. mutans* também foram observadas entre as fases T6, T12 e T18. Cerca de trinta e oito por cento (n=12) dos amplitipos isolados de 22 crianças em T6 foram re-isolados após 6 meses (T12) e 25% (n=8) foram novamente isolados em T18 (Tabela 6). Os oito amplitipos re-isolados em T12 e T18 foram identificados em 14 crianças que apresentavam níveis de *S. mutans* variando de 1 a 100 ufc (mediana = 95 ufc/área). Oito crianças infectadas em T6 pelos outros 24 amplitipos não re-isolados em T12, possuíam níveis de *S. mutans* variando de 1 a 100 ufc em T6 (mediana: 91,5/área) e 4 a 100 ufc em T18 (mediana: 86,5/área). Estes dados demonstram que amplitipos que infectam crianças em idade precoce (entre 11 a 19 meses de idade) podem persistir por pelo menos um ano na cavidade bucal, independentemente dos níveis de infecção inicial (Figura 8).

Tabela 5 - Diversidade de amplitipos de *S. mutans* entre as crianças infectadas nas fases inicial (T0), 6 (T6), 12 (T12) e 18 (T18) meses do estudo prospectivo.

Fases do estudo	Número de crianças infectadas	Número de isolados	Número de amplitipos	Número (%) de crianças infectadas com:	
				1 amplitipo ^β	>1 amplitipo
T0 (n=160)	9* ^a	25	8	5 (83,4%)	1 (16,6%)
T6 (n=141)	22 ^b	162	34	14 (63,6%)	8 (36,4%)
T12 (n=131)	42 ^c	287	62	27 (64,3%)	15 (35,7%)
T18 (n= 119)	48	345	62	36 (75,0%)	12 (25,0%)

* cepas de *S. mutans* de três crianças não foram recuperadas após cultivo. ^a Três crianças apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans* tanto em T0 como em T6. ^b Quatorze crianças apresentaram níveis detectáveis tanto em T6 como em T12. ^c Trinta e três crianças apresentaram níveis detectáveis tanto em T12 como em T18.

^β Diferenças estatisticamente significantes com relação à prevalência de amplitipos (1 ou > 1) em T0 e T18: χ^2 : 7,23; p=0,00 e χ^2 : 7,59; p=0,005, respectivamente.

Tabela 6 - Persistência de amplitipos *S. mutans* isolados nos períodos iniciais entre as 42 crianças que mantiveram níveis detectáveis de *S. mutans* em pelo menos duas visitas do estudo prospectivo.

Número de amplitipos isolados em:	Nº. (%) de amplitipos					
	Não detectados em T6	Re-isolados em T6	Não detectados em T12	Re-isolados em T12	Não detectados em T18	Re-isolados em T18
T0 (n=8) ^a	6 (75%)	2 (25%)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (100%)	0 (0%)
T6 (n=32) ^b	-	-	20 (62,5%)	12 (37,5%)	24 (75%)	8 (25%)
T12 (n=62)	-	-	-	-	32 (51,6%)	30 (48,4%)
Total	6 (75%)	2 (25%)	27 (67,5%)	13 (32,5%)	64 (62,7%)	38 (37,3%)

^a Um total de 3 amplitipos foram isolados de 3 crianças (T0) que não apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans* em T6 e 5 amplitipos isolados de 5 crianças (T0) *S. mutans*-negativas em T12. ^b Um total de 7 amplitipos foram isolados de 5 crianças (T6) que não apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans* em T12. Outros 6 amplitipos, isolados de 3 crianças (T6) que deixaram o estudo na fase T12, não foram incluídos nesta tabela.

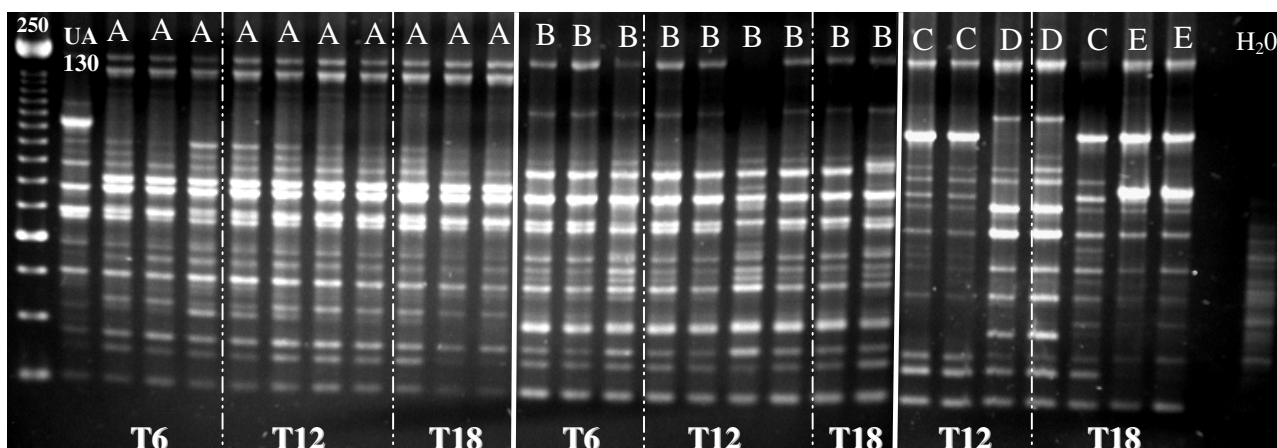


Figura 8. Gel representativo da análise de AP-PCR (OPA-02) realizada em vinte e seis isolados de *S. mutans* de três crianças infectadas inicialmente, em T6 ou T12. As linhas contínuas separam os isolados das três crianças avaliadas e as linhas tracejadas separam as fases do estudo de cada criança. Letras sobre cada canaleta indicam as identidades genotípicas. As letras diferentes representam amplitipos distintos. As primeiras duas crianças, com 13 e 18 meses de idade em T6, apresentaram baixa diversidade genotípica: um único amplitipo foi isolado durante todo estudo (**A** e **B**). A terceira criança apresentou dois amplitipos identificados desde o momento da aquisição inicial (16 meses). Os amplitipos das três crianças foram re-isolados nas visitas subsequentes T12 e T18 (**A**, **B**, **C** e **D**). Um novo amplitipo foi identificado na terceira criança em T18 (**E**).

5. 4 *Análise de vias potenciais de transmissão de S. mutans*

5. 4. 1 **Rastreamento de transmissão horizontal de amplitipos de *S. mutans* entre crianças que freqüentavam as mesmas creches**

Os bebês avaliados no presente estudo passam dez horas diárias nas creches durante cinco dias por semana. Portanto, a população estudada apresenta potencial de infecção por fontes não maternas de transmissão de *S. mutans*, uma vez que o contato com as mães no ambiente familiar é menos duradouro e há contato prolongado com indivíduos sem relação familiar. O

rastreamento da transmissão horizontal de *S. mutans* foi realizado através da comparação dos perfis genotípicos de *S. mutans* (AP-PCR) entre crianças que freqüentavam a mesma creche. Médias de 5,7, 5,0, 4,7 e 4,3 crianças por creche freqüentavam estas instituições nos períodos T0, T6, T12 e T18, respectivamente. Em média, as creches apresentavam 0,29 ($\pm 0,71$), 0,79 ($\pm 0,79$), 1,5 ($\pm 1,1$) e 1,8 (1,2) crianças infectadas por *S. mutans*, nas fases T0, T6, T12 e T18, respectivamente.

Um total de 19 EMEIs apresentaram pelo menos duas crianças com níveis detectáveis de *S. mutans*, para que os amplitipos pudessem ser comparados. Durante o estudo, foram identificadas 16 crianças que freqüentavam as mesmas creches compartilhando amplitipos de *S. mutans* idênticos e/ou muito semelhantes nas análises visuais. Em 5 creches, um par de crianças compartilhou um amplitipo, enquanto que em outras duas, mais crianças compartilhavam amplitipos. A coincidência de amplitipos observada entre as crianças nas sete creches foi definida considerando-se coeficiente *Dice* de similaridade de amplitipos igual ou maior que 95%. A análise dos dendrogramas de similaridade construídos mostrou que crianças que compartilham ambientes como as salas das creches, podem apresentar amplitipos de *S. mutans* idênticos em até 100% de similaridade com os dois *primers* (OPA-02 e OPA-03), o que configura a transmissão horizontal. Outros dendrogramas de análise de similaridade entre isolados de crianças da mesma creche estão no apêndice 4.

A observação dos dendrogramas ilustrados nas Figuras 9 a 12 permite verificar as distâncias genéticas entre cepas representativas de *S. mutans* detectadas em cada criança nas creches, em diversos momentos do estudo. O padrão de similaridade obtido entre os diferentes amplitipos detectados nas crianças que compartilhavam o mesmo ambiente nas creches foi alto. Em nove casos foi maior que 95%, dentre os quais, três deles esteve com 100% de similaridade. As Figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram através dos dendrogramas dois casos de clones similares entre bebês em duas creches, utilizando dois *primers*. Em seguida são também apresentados os respectivos géis.

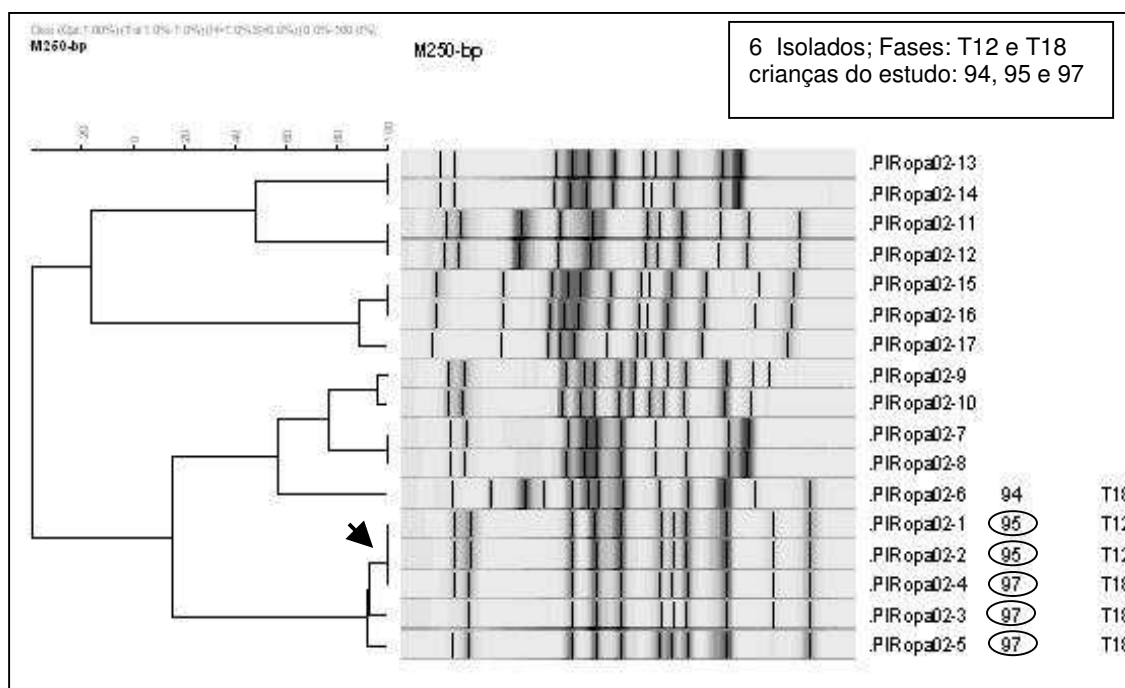


Figura 9. Dendrograma representativo de diferentes amplitipos obtidos com **OPA-02** em três crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “95” e “97”, foram similares em 100% (seta) (coeficiente *Dice*), porém isolados em tempos diferentes do estudo, T12 e T18, respectivamente. O amplitipo representativo do bebê “94” não foi similar aos de outras crianças. As demais cepas da criança “97” foram similares à anterior (> 95%).

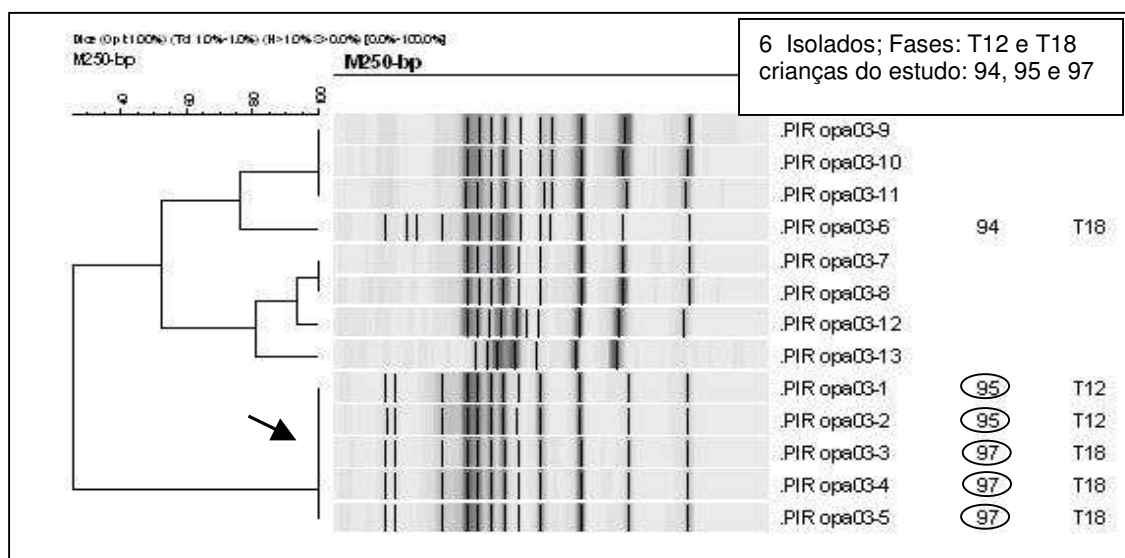


Figura 10. Dendrograma representativo de diferentes amplictipos de *S. mutans* obtidos com **OPA-03** em crianças de uma creche. Todos os amplictipos de dois bebês, “95” e “97”, foram similares em 100% (seta) (coeficiente *Dice*). Foram isolados em tempos diferentes do estudo, T12 e T18, respectivamente. O amplictipo representativo do bebê “94” não foi similar.

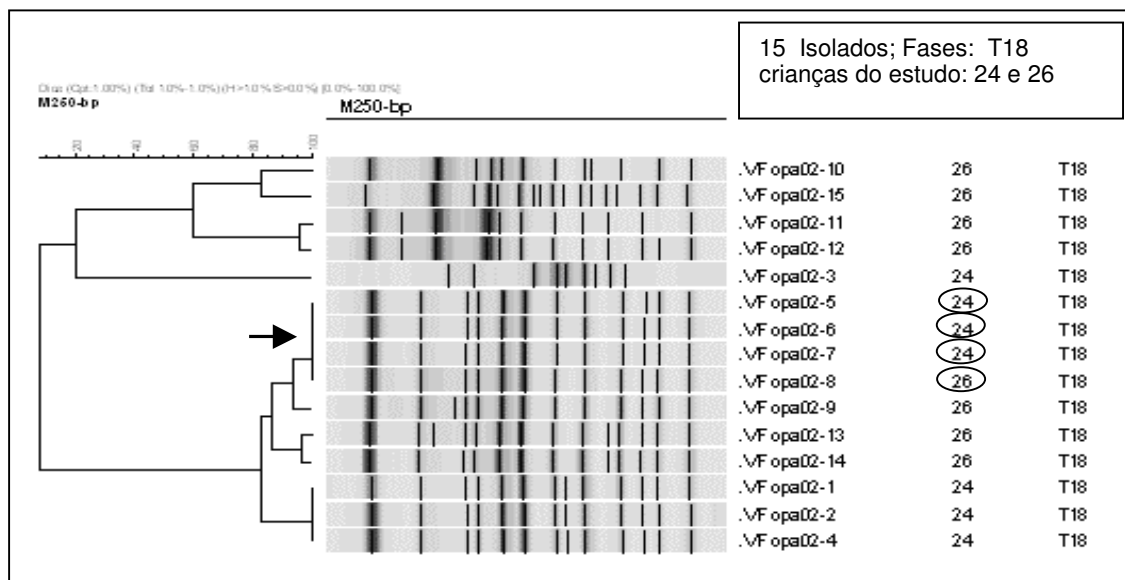


Figura 11. Dendrograma representativo de diferentes amplictipos de *S. mutans* obtidos com **OPA-02** em crianças de uma creche. Os amplictipos de duas crianças, “24” e “26”, foram similares em 100% (seta) (coeficiente *Dice*). Foram isolados em um mesmo tempo de coleta (T18). Três clones da criança “24” foram iguais entre eles (100%) e alguns da criança “26” também (>95%).

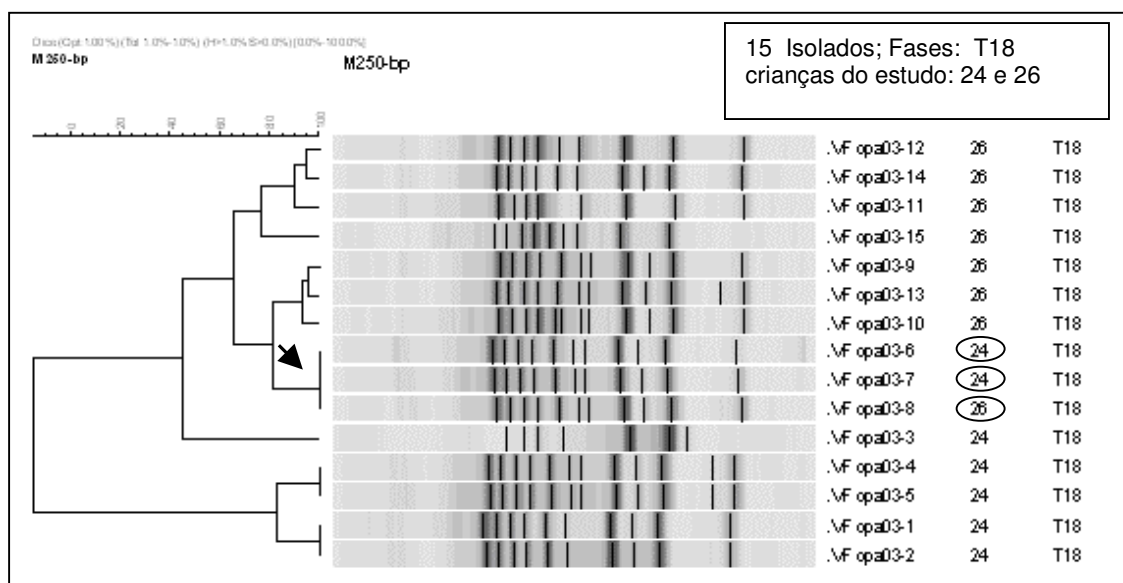


Figura 12. Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* obtido com **OPA-03** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “24” e “26”, foram similares em 100% (seta) (coeficiente *Dice*). Foram isolados em um tempo único de coleta (T18).

Na Tabela 7, estão resumidas as principais características das crianças que compartilharam amplitipos similares nas análises visuais dos géis de AP-PCR realizados com dois *primers*. Os amplitipos compartilhados foram identificados na mesma fase ou em fases distintas do estudo. A diversidade genotípica ao longo do estudo caracteriza a amostra, pois alguns clones inicialmente determinados não foram re-isolados, enquanto novos clones foram encontrados. Para a criança “154” em T18, não foram detectados os mesmos amplipos que em T12, adquirindo um clone novo, que foi diferente da criança “155”. Em T18, na criança “53” não se identificou dois amplitipos, mas conservou o mais prevalente, sendo este similar ao da criança “156” (menos prevalente em T12). Em “156” não foi identificado o amplitipo similar em T18, permanecendo com um diferente do anterior, mas similar ao amplitipo do bebê “46”. A criança “26” adquiriu um clone materno em T12. Na amostragem seguinte (coleta de T18), esta criança adquiriu um clone de outra da mesma creche “24”, e mais um clone da mãe, ficando agora com dois amplitipos.

As Figuras 13 e 14 ilustram os perfis de AP-PCR e definição dos amplitipos de dois bebês que conviveram na mesma creche e compartilharam amplitipos muito semelhantes. A Figura 13-A mostra a análise realizada com o *primer* OPA-02 e a 13-B ilustra análise realizada com o *primer* OPA-03. A Figura 14 representa um caso de dois bebês com amplitipos idênticos detectados entre os isolados. Por outro lado, outros amplitipos distintos foram observados nos isolados de ambos os bebês, exemplificando a diversidade de amplitipos entre os isolados clínicos de *S. mutans*.

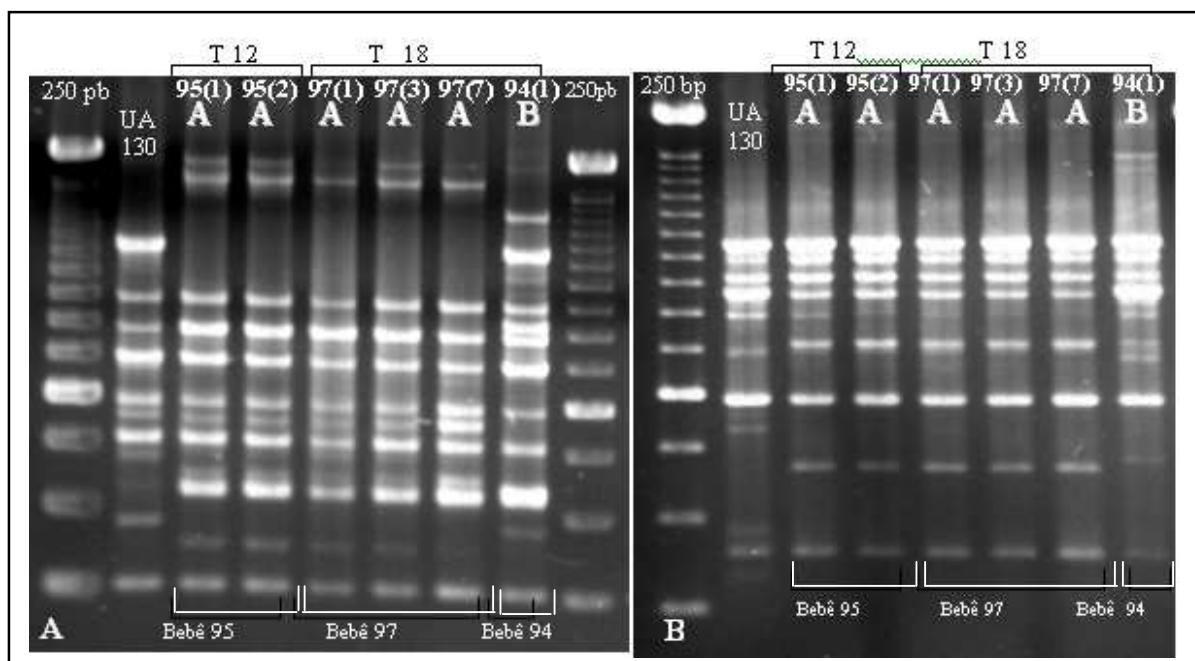


Figura 13. Gel representativo da análise de AP-PCR realizada em 12 isolados de três crianças de 28, 21 e 29 meses de idade com *S. mutans* detectáveis em T12 e T18, e pertencentes à mesma EMEI. Os números acima de cada canaleta indicam o número do isolado de *S. mutans*. As letras correspondentes indicam o padrão de AP-PCR (amplitipos). As chaves delimitam as canaletas de isolados de um mesmo bebê. O número da criança é indicado abaixo. A) Amplitipos determinados com *primer* OPA02. Observa-se similaridade dos isolados de duas crianças da mesma creche (crianças 95 e 97; amplitipo **A**). A mesma similaridade não foi observada na cepa isolada do bebê 94 (amplitipo **B**), o qual freqüentava a mesma EMEI. O grau de similaridade foi de 100%, podendo ser confirmada por análise com outro *primer* arbitrário, OPA-03 (B).

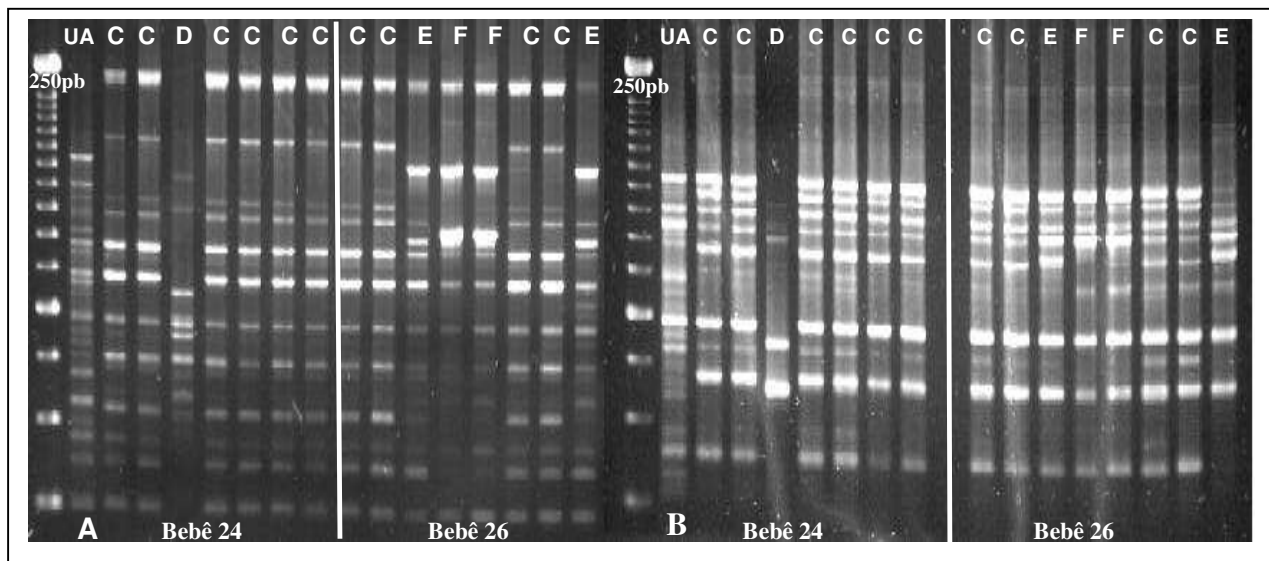


Figura 14. Gel representativo da análise de AP-PCR realizada em 15 isolados clínicos de duas crianças de 26 e 24 meses de idade com *S. mutans* detectáveis ambas em T18, e pertencentes à mesma EMEI. As linhas contínuas separam os isolados das crianças distintas. **(A)** Similaridade dos amplictipos nos isolados de dois bebês da mesma creche com o *primer* OPA-02 (amplictipo **C**, nos bebês 24 e 26). Outros perfis genotípicos diferentes foram também observados em ambas (**D**, **E** e **F**). O grau de similaridade em relação ao amplictipo **C** foi de 100%, podendo ser confirmada por análise com o *primer* arbitrário, OPA-03 **(B)**. UA: cepa padrão de *S. mutans* UA130.

Tabela 7 - Similaridade genotípica (AP-PCR) de cepas de *S. mutans* de bebês freqüentadores de sete creches e isolados durante o estudo longitudinal (T0 a T18).

Criança (sexo)	Creches ^β	Fase de detecção inicial de <i>S. mutans</i> em meses	Características na fase de detecção inicial		Idade (meses) de coincidência de amplitipos	Fase de isolamento do amplitipo	Nº amplitipos /nº amplitipos similares (nº. isolados)
			Nº dentes irrompidos	Nº de lesões de cárie (cavidade / mba)			
95* (m)	1	21	16	0/0	21	T12	1/1 (2)
97 (m)		29	20	0/0	29	T18	1/1 (8)
154 (f)	2	22	14	0/0	22	T12	3/1 (8)
155 (m)		19	16	0/0	19	T6	4/1 (5)
118 (f)	3	24	20	0/3	24	T12/T18	1/1 (1/8)
120* (m)		21	16	0/0	21	T6	2/1 (9)
53 (f)	4	22	16	4/11	22	T12/T18	3/1 (8/9)
156 (m)		21	16	1/0	21	T12	2/1 (9)
46 (m)		19	8	0/1	19	T12/T18	1/1 (8/8)
65 (f)	5	22	17	1/0	22	T12/T18	1/1 (8/8)
66 (f)		24	18	0/0	24	T18	1/1 (1)
24 (f)	6	26	16	0/0	26	T18	2/1 (7)
26 (m)		18	15	1/2	24	T18	3/1 (8)
81 (f)	7	8	02	0/0	8	T0/T6	1/1 (1/3)
84 ² (f)		22	17	0/4	22	T12/T18	1/1 (8/6)
85 ² (f)		22	17	0/4	22	T12/T18	1/1 (6/8)

m: masculino, f: feminino * bebês deixaram o estudo na fase seguinte; ² bebês gêmeos univitelinos.

^β Análise da distribuição de creches com detecção de transmissão de amplitipos entre bebês (sete creches das dezenove comparadas): χ^2 : 1,15; p=0,28.

5. 4. 2 *Frequência e níveis de infecção das auxiliares de saúde por S. mutans, diversidade genotípica e rastreamento da transmissão horizontal de amplitipos de S. mutans entre as auxiliares e as crianças.*

Das 91 auxiliares que cuidavam das crianças nas 28 EMEIs durante o estudo longitudinal, 92,3% (n=84) apresentaram níveis detectáveis de *S. mutans*. Foi realizada a identificação genotípica por AP-PCR de 446 cepas de *S. mutans* em 61 cuidadoras de 23 EMEIS que cuidavam dos 67 bebês infectados nas fases T0 a T18. Um total de 100 amplitipos distintos foram isolados, dentre uma média de 7,5 (7,8±0,96) isolados de *S. mutans* testados por auxiliar de saúde. A análise de AP-PCR demonstrou uma média de 1,7 (±1) amplitipos por auxiliar, sendo que o número de amplitipos identificados por auxiliar variou de um a cinco. A Tabela 8 mostra a distribuição das cuidadoras (analisadas entre T0 e T18), segundo os níveis bucais de *S. mutans* e número médio de amplitipos identificados. O total de 34 auxiliares (51,5%) apresentou altos níveis de *S. mutans* (≥100 ufc) na cavidade bucal, sugerindo potencial de transmissão de *S. mutans* para as crianças.

Tabela 8 - Níveis de infecção e diversidade genotípica de *S. mutans* em 66 auxiliares de saúde de 23 EMEIs relacionadas aos 67 bebês *S. mutans*-positivos ao longo do estudo.

Níveis bucais de <i>S. mutans</i> (ufc)	Número (%) de cuidadores	Número de isolados testados ^a	Número total de amplitipos (média; ±dp) ^a
0 ufc	5 (7,6%)	-	-
1-20 ufc	9 (13,6%)	66	12 (1,33 ± 0,5)
21-99 ufc	18 (27,3%)	130	25 (1,5 ± 0,62)
≥100 ufc	34 (51,5%)*	250	63 (1,9 ± 0,98)
Total	66 (100%)	446	100 (1,7±1,0)

.^a isolados das cuidadoras com *S. mutans* > 0. Comparação da prevalência de cuidadoras com níveis altos (≥100 ufc) com os níveis mais baixos (0 e 1-20ufc): * χ^2 : 7,23; p=0,01

A análise genotípica dos subgrupos de auxiliares e crianças não revelou amplitipos coincidentes entre as primeiras e as respectivas crianças. A Figura 15 ilustra a comparação de amplitipos de duas delas e duas crianças que permaneciam juntas em uma mesma EMEI durante o estudo. Embora as crianças apresentassem mais de um amplitipo na cavidade bucal, nenhum deles correspondeu aos amplitipos identificados nas auxiliares. A Figura 16 ilustra a comparação de amplitipos de uma auxiliar e os respectivos amplitipos de duas crianças da mesma creche, em fase final do estudo (T18) não apresentando similaridade. Mesmo naquelas que apresentaram altos níveis de *S. mutans* na cavidade bucal e alta diversidade genotípica dos isolados (5 amplitipos), não foram detectados amplitipos coincidentes entre auxiliares e crianças.

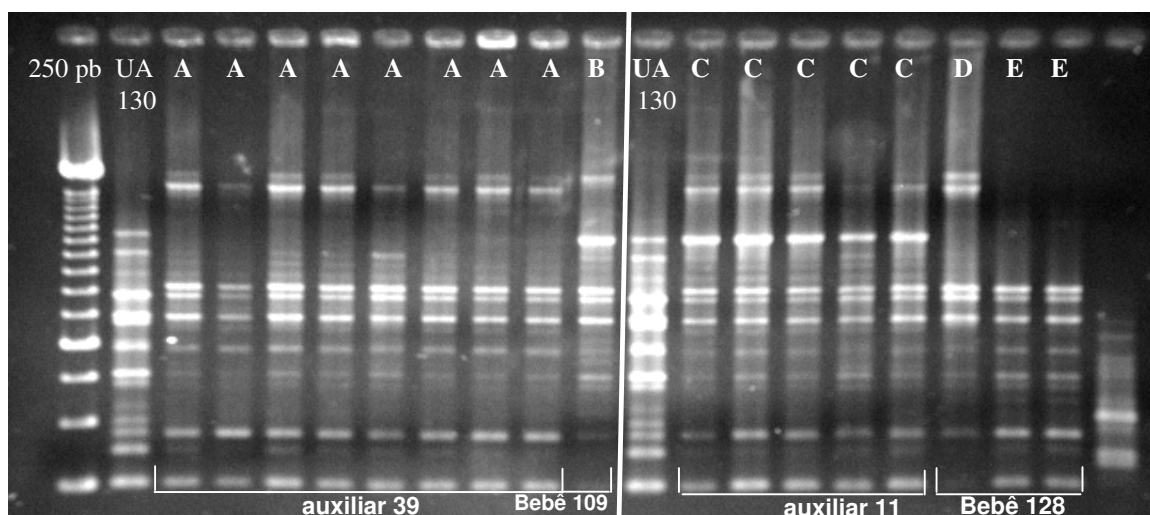


Figura 15. Gel representativo das análises de AP-PCR (OPA-02) realizadas em 18 isolados clínicos representativos de dois subgrupos auxiliar-criança de duas EMEIs. As cuidadoras e respectivas crianças (ambas de 18 meses de idade) apresentavam altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc) em T6. Os diferentes amplitipos são identificados por letras acima de cada canaleta. A linha contínua separa os amplitipos das cuidadoras e bebês de uma mesma EMEI. A letra **A** representa um amplitipo de 8 isolados da primeira auxiliar, sendo comparado ao amplitipo **B**, representativo dos isolados de uma criança da mesma creche. A letra **C** corresponde a um amplitipo de 5 isolados de uma auxiliar de outra creche, diferente dos amplitipos **D** e **E**, representativos dos isolados da criança de creche correspondente. Não se observou amplitipos iguais entre as auxiliares e as crianças, mesmo quando esta última apresentou dois amplitipos.

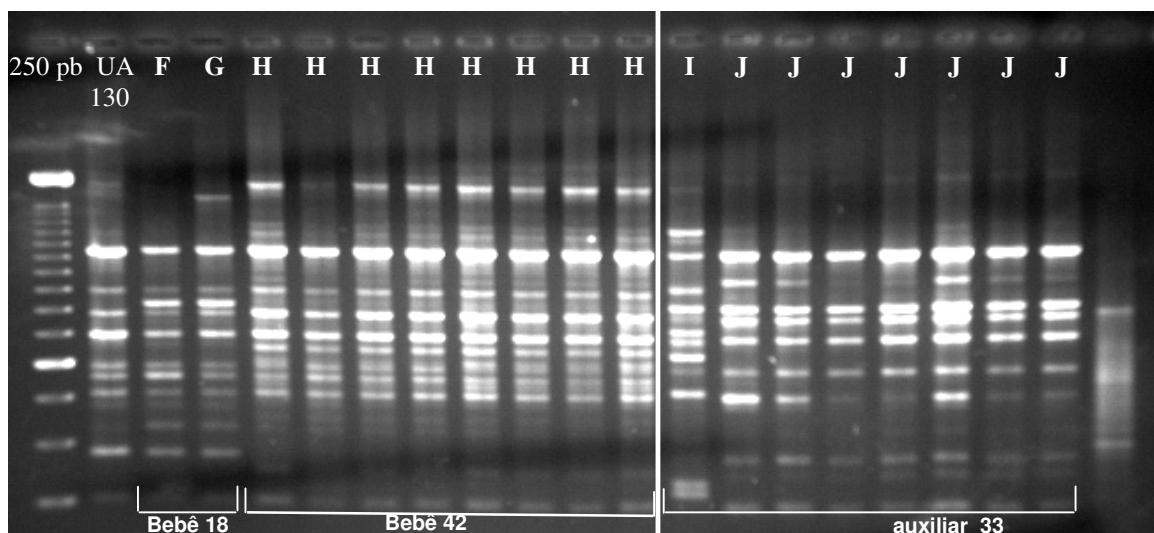


Figura 16. Gel representativo da análise de AP-PCR realizadas em 18 isolados clínicos de uma auxiliar e duas crianças de 22 meses de idade com altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc) em T18, da mesma EMEI. Os diferentes amplitipos são identificados por letras acima de cada canaleta. A linha contínua separa os amplitipos da auxiliar de saúde dos amplitipos dos bebês. As letras **F e G** correspondem aos dois amplitipos representativos dos isolados uma criança, sendo comparado ao amplitipo **H**, também representativo dos isolados de outra criança da mesma creche. As letras **I e J** correspondem aos dois amplitipos de 8 isolados de uma cuidadora da mesma creche, entretanto, diferentes dos amplitipos da criança.

5. 4. 3 Frequência e níveis de infecção por *S. mutans* em um sub-grupo de mães: diversidade genotípica e rastreamento da transmissão vertical de amplitipos de *S. mutans* entre mães e crianças.

As fontes não maternas de infecção por *S. mutans* foram investigadas através da comparação de amplitipos entre crianças que frequentavam a mesma creche e, entre crianças e as respectivas cuidadoras. Entretanto, não foi identificado nenhum caso de semelhança de amplitipos entre as crianças e suas respectivas auxiliares. Como controle, 16 mães de um subgrupo de 17 crianças foram também estudadas. Este subgrupo constou das mães das crianças que apresentavam altos níveis de infecção por *S. mutans* em todas as fases. Do total de mães examinadas, 68,8% (n=11) apresentaram altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc). Um total de 125 isolados das 16 mães foi analisado para as comparações (Tabela 9). O total de um a quatro amplitipos foi identificado por mãe,

determinados por AP-PCR, com OPA-02. Dentre as 16 mães cujas crianças foram estudadas, 50% (n=8), apresentaram coincidência de amplitipos com os dos respectivos filhos.

Tabela 9 - Níveis de infecção e diversidade genotípica em um subgrupo de 16 mães de 17 crianças com níveis detectáveis de *S. mutans*, e número de amplitipos compartilhados entre mãe-filho(a).

Níveis de <i>S. mutans</i>	Nº. de mães	Nº.de isolados testados (nº. de amplitipos identificados)	Nº. de mães com >1 amplitipo(%)	Pares mãe-filho(a) com amplitipos coincidentes (%)	Nº. de amplitipos coincidentes em pares mães-filho(a)
1-20 ufc	2	13 (2)	- (0%)	1 (12,5%)*	1
21-99 ufc	3	24 (6)	2 (22,2%)	- (0%)	-
≥100 ufc	11	88 (26)	7 (77,8%)	7 (87,5%)	7
Total	16	125 (34)	9 (100%)	8 (100%)	8

* amplitipo materno coincidente com amplitipos dos filhos gêmeos

A tabela 10 apresenta a distribuição dos amplitipos e fases de detecção dos mesmos nas crianças e suas respectivas mães.

Tabela 10 - Distribuição dos amplitipos de *S. mutans* isolados da cavidade bucal de um subgrupo de 16 mães e seus respectivos filhos(as), durante as diferentes fases do estudo.

Número da criança (gênero)	Amplitipo da criança ^{a, c}			Amplitipo da mãe ^{a, c}
	T6 ^{(idade)1}	T12 ^{(idade)1}	T18 ^{(idade)1}	T18
<i>Casos com transmissão mãe-criança</i>				
26 (m)	-	A ⁽¹⁸⁾	A, B, C	A, B
78 (f)	-	D, E ⁽²⁴⁾	D	D, F, G
84/85* (f)	-	H ⁽²²⁾	H	H
105 (f)	-	I, J ⁽²⁴⁾	J	J
108 (f)	K, L ⁽¹⁹⁾ , M, N		K, O	M
115 (m)	-	P ⁽¹⁸⁾	Q	P, R, S, T
24 (f)	-	-	Z', W' ⁽²⁶⁾	W', Y', D'', E''
144 (m)	-	A'', B'', C'' ⁽²⁴⁾	A'', B'', C''	A''
<i>Casos sem transmissão mãe-criança</i>				
31 (m)	-	U, V ⁽²³⁾	U, V	X, Y, Z
49 (m)	-	W ⁽²¹⁾	W	A'
61 (m)	B' ⁽¹³⁾	B'	B'	C'
65 (f)	-	D', E' ⁽²²⁾	D'	F', G', H'
117 (m)	I', J' ⁽¹⁸⁾	I'	I'	K'
122 (f)	-	L' ⁽²⁶⁾	L'	M', N'
145 (m)	O ⁽²⁰⁾	O'	O'	P', Q', R'
156 (m)	-	T', U' ⁽²¹⁾	T'	V', X'
Total de amplitipos detectados	6	23	23	33
Total de amplitipos coincidentes	0	7 ^β	7 ^β	9

* irmãos gêmeos. (f): feminino;(m): masculino

¹ média de idade (em meses) de aquisição inicial de *S. mutans* pelos 17 bebês: 21,2 (±3,4).

^a as letras maiúsculas indicam amplitipos detectados nos indivíduos. Os amplitipos indicados pelas mesmas letras apresentam-se idênticos.

^c as médias do número de amplitipos recuperados nas mães e filhos foram 2,0 (±1,30) e 1,28 (±0,61).

^β Análise da distribuição de amplitipos detectados nas mães e os transmitidos às crianças: χ^2 : 1,03; p>0,05 (não significante).

A Figura 17 ilustra um exemplo onde não foi possível observar similaridade entre as cepas de *S. mutans* isoladas da cavidade bucal da mãe com as do seu filho. Neste caso, a criança apresentou um único amplitipo durante todo estudo (T6 a T18), entretanto tal amplitipo não foi similar ao materno. A Figura 18 ilustra um caso de concordância de amplitipos detectados na criança e respectiva mãe, onde a criança apresentou uma maior diversidade durante o momento inicial da aquisição de *S. mutans*, representada pelos dois amplitipos identificados.

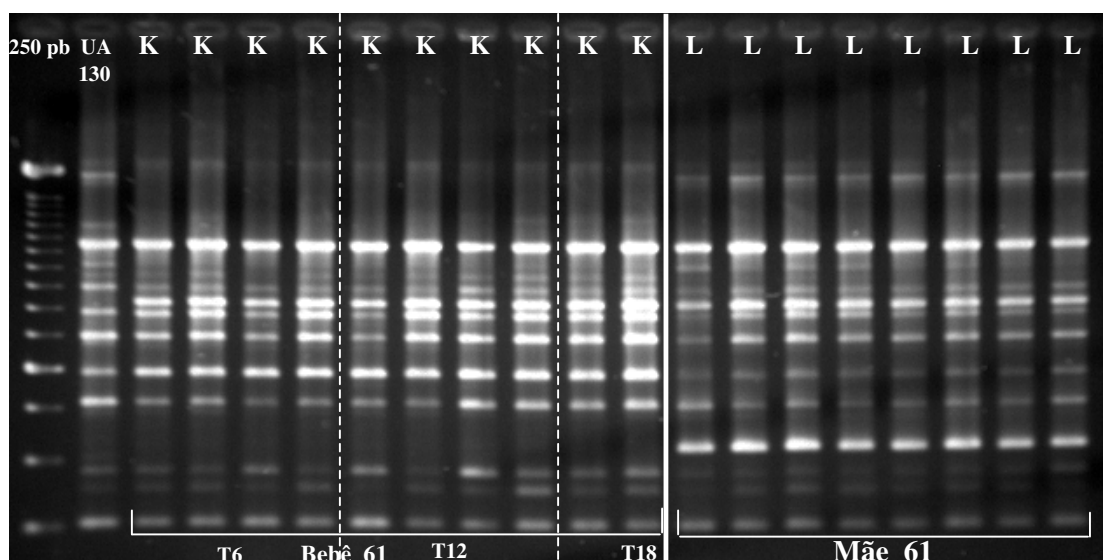


Figura 17. Gel representativo das análises de AP-PCR (OPA-02) realizadas em 10 isolados clínicos de uma criança com altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc) em T6, T12 e T18 e dos 8 isolados da mãe. Em T6, a criança apresentava 13 meses de idade. Os diferentes amplitipos são identificados por letras acima de cada canaleta. A linha contínua separa os isolados da criança dos isolados materno. As linhas pontilhadas separam os isolados obtidos da criança nas diferentes fases do estudo. A letra **K** representa um único amplitipo identificado em todos os momentos, sendo comparado ao amplitipo **L**, de origem materna, porém não similar.

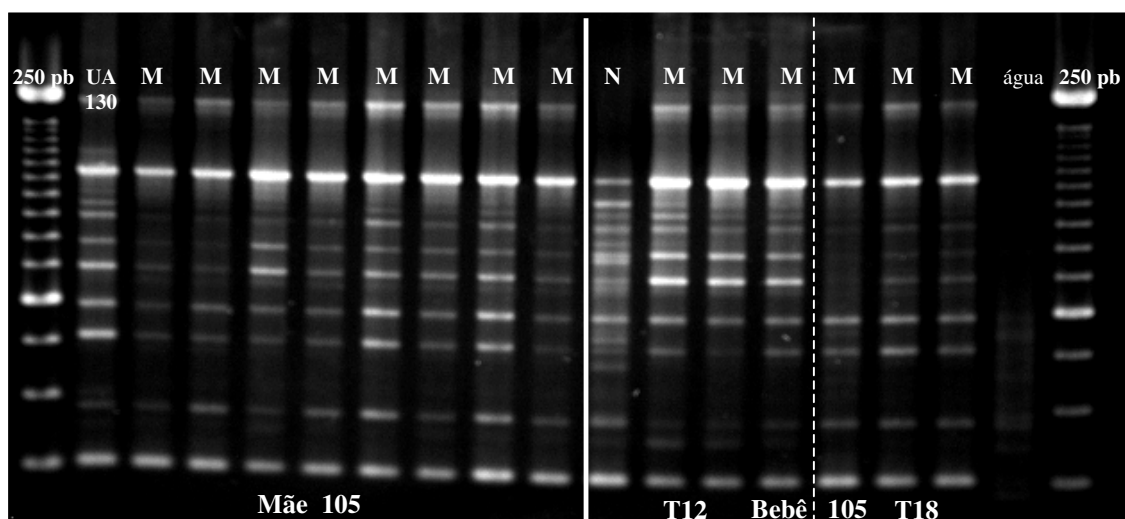


Figura 18. Gel representativo das análises de AP-PCR (OPA-02) realizadas em 8 isolados clínicos de uma mãe do sub grupo e 7 isolados representativos do filho de 30 meses de idade, em T12 e T18. Os diferentes amplictipos são identificados por letras acima de cada canaleta. A linha continua separa os isolados dos bebês dos isolados maternos, e as pontilhadas separam os dois momentos do estudo, onde o bebê foi positivo para *S. mutans*, com dois amplictipos detectados. A letra **M** representa um único amplictipo originado dos isolados da mãe, similar ao identificado na criança em dois momentos (T12 e T18). Um outro amplictipo **N** foi identificado em T12.

6. DISCUSSÃO

6. 1 *Características clínicas e comportamentais dos bebês avaliados*

No Brasil, o Projeto Saúde Bucal (2003) mostrou que 27% das crianças entre 18 e 36 meses e, aproximadamente 60% das crianças de cinco anos de idade apresentavam pelo menos um dente decíduo cariado ($ceo \geq 1$). Em média, uma criança brasileira apresenta pelo menos um dente cariado em torno dos três anos de idade e três dentes cariados na idade de cinco anos. As diferenças regionais são perceptíveis em todas as idades, e as condições de saúde bucal são piores nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, quando comparado às regiões Sul e Sudeste (Projeto SB Brasil 2003, Ministério da Saúde, 2004).

Como o esperado, as crianças acompanhadas por 18 meses neste estudo apresentaram aumento nos percentuais de lesões cariosas; cavidades e manchas brancas ativas com a idade, sendo que ao atingirem a faixa etária de 23 a 30 meses de idade a prevalência de cavidades de cárie foi de 19,3%. Após 12 (T12) e 18 (T18) meses de acompanhamento, foram observadas diferenças significativas quanto à prevalência de lesões cavitadas quando comparados os grupos de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* (35,7 e 47,9%, respectivamente) e sem níveis detectáveis de *S. mutans* (1,1 e 1,4, respectivamente) (Tabela 1). Vários estudos na literatura apontam associação positiva entre índices/prevalência de cárie e presença de *S. mutans* na cavidade bucal (KÖHLER *et al.*, 1988; CAUFIELD *et al.*, 1993; ALALUUSUA *et al.*, 1996; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998). As lesões de cárie (mba e cavidade) aumentam em função do aumento da idade e do número de dentes erupcionados, provavelmente devido ao número crescente de superfícies dentárias expostas e à continuidade dos hábitos deletérios, como em outros estudos já citados (LEITE & RIBEIRO, 2000; BARROS *et al.*, 2001; ROSEMBLATT & ZAZAR, 2004).

A prevalência de cárie, incluindo as lesões de manchas brancas ativas, ao final do estudo (T18) quando as crianças atingiram 23 a 30 meses de idade, foi

de 36,1%, apesar da cidade de Piracicaba possuir água fluoretada desde 1971. Este percentual encontrado foi menor que as prevalências observadas por BONECKER *et al.* (1997), em Diadema (São Paulo) e BARROS *et al.* (2001), em Salvador (Bahia). A primeira amostra envolveu crianças de 1 a 59 meses e o segundo estudo, crianças de 0 a 30 meses. As prevalências observadas foram 66,5% e 55,3%, respectivamente. No estudo de ROSEMBLATT & ZAZAR (2004), onde apenas as lesões cavitadas foram computadas, em uma população de crianças de 12 a 36 meses de baixa renda na cidade de Recife, os autores encontraram uma prevalência de 28,4%. A prevalência de cárie em crianças de 18 a 36 meses de idade em diversas regiões do Brasil é, portanto superior ao relatado em outros países como citado por SERWINT *et al.* (1993) reportando que 20% de 110 crianças mexicano-americanas apresentaram cárie de mamadeira. Por outro lado, prevalências muito menores (1 a 12%) que as encontradas no Brasil já foram citadas em outros países, como a Suécia (WENDT *et al.*, 1991; O'SULLIVAN & THIBODEAU, 1996).

A prevalência de cárie em estudo anterior em população de creches de Piracicaba e com as mesmas características deste estudo, especialmente a alta ingestão de sacarose, MATTOS-GRANER *et al.* (1996) observaram 34,8% entre zero e 36 meses de idade, incluindo lesões de mba e cavitadas, semelhante ao detectado no presente estudo. No estudo anterior, as superfícies mais acometidas por lesões de cárie foram as oclusais dos molares (56,6%). Muitas lesões iniciais de manchas brancas (32,4%) foram também detectadas nas superfícies vestibulares de incisivos e caninos (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996). Este perfil é característico da cárie de acometimento precoce (RIBEIRO & RIBEIRO, 2004). As manchas brancas decorrentes da desmineralização do esmalte são sinais precoces e clinicamente identificáveis da doença instalada e, quando não tratadas, podem evoluir às lesões cavitadas num período de seis a doze meses (WEINSTEIN *et al.*, 1992; RIBEIRO & RIBEIRO, 2004).

Estudos incluindo manchas brancas ativas (WEINSTEIN *et al.*, 1992) demonstraram a instalação precoce da doença e a importância do diagnóstico e

atenção em seus estágios iniciais, evitando o desenvolvimento de lesões mais severas em idade avançada. Neste estudo, optou-se pela inclusão da mba visto tratar-se de lesão característica na faixa etária de 10-20 meses e, por permitir uma avaliação da atividade de cárie e a implantação de medidas educativas e curativas em idade e estágio precoce da lesão. A alta frequência das lesões incipientes ao final do estudo (27,7%) na população avaliada reforça a importância da inclusão da mba nos estudos em bebês.

O uso prolongado da mamadeira noturna foi relatado por 78% das 100 mães que responderam aos questionários. Cinquenta e sete por cento das mães acrescentavam açúcar refinado à mamadeira e/ou componentes “espessantes”, como amido de milho, farelo de trigo ou aveia. Este hábito dietético caseiro, somado às refeições na creche, caracteriza o quadro de dieta com alta concentração de sacarose, o que pode favorecer a colonização precoce por *S. mutans* e o desenvolvimento da doença cárie.

Existe ainda uma grande dificuldade para conseguir a colaboração dos pais ou responsáveis na realização de manobras preventivas no âmbito doméstico. O comparecimento ao CEPAE foi estimulado pela pesquisadora durante todo acompanhamento, através de avisos, telefonemas e orientação às diretoras e agentes de saúde das creches. Entretanto, nem todas as mães das crianças compareceram às palestras ou mesmo para o tratamento de adequação do meio bucal quando da presença de cavidades abertas nos dentes decíduos.

Neste estudo, foi acompanhada uma coorte de 160 crianças institucionalizadas em creches públicas da cidade de Piracicaba, inicialmente com 5-13 meses de idade. Foi possível observar no *baseline* (T0) um bebê de treze meses de idade, e já infectado com altos níveis de *S. mutans* (≥ 100 ufc), apresentando ainda duas lesões cavitadas nos primeiros molares decíduos e quatro lesões de mba nos incisivos superiores. Esta criança fazia uso da mamadeira noturna com alto teor de sacarose e “espessantes”, além da dieta cariogênica na creche. Considerando o objetivo principal da pesquisa, de comparar amplitipos de *S. mutans* entre os bebês atendidos nas mesmas creches

e entre estes e as auxiliares de saúde, e apesar do tipo de estudo prospectivo, optou-se por manter esta criança no acompanhamento, já que fazia parte de uma creche onde existiam seis bebês inicialmente no estudo. Desta forma, este bebê foi o responsável pela alta prevalência de cárie (11%) no grupo de crianças com *S. mutans* detectável no momento inicial do estudo (T0) (Tabela 1).

Um total de 41 crianças deixou o estudo (19 em T6, 10 em T12 e 12 em T18), pois mudaram de creche, de município ou permaneceram um longo tempo sem freqüentar a creche por problemas de saúde. Este percentual (25,6%), foi inferior ao predito, sendo que a amostra final constou de 119 crianças. As médias de idade das crianças que saíram do estudo não diferiram estatisticamente das médias de idade das crianças que permaneceram nas etapas consecutivas. Das 41 crianças que deixaram o estudo, apenas uma apresentava lesões de cárie, sendo cinco cavitadas e duas mba. Esta criança saiu antes da última avaliação (T18) e nunca compareceu juntamente com a mãe às palestras promovidas pelo CEPAE, tampouco ao atendimento clínico, conforme orientação. Sendo assim, a criança permaneceu em atividade de cárie até o momento em que saiu do estudo, apresentando alto consumo de sacarose por meio de mamadeira noturna. As lesões de mba progrediram para lesões cavitadas ativas em dentina, tanto em molares quanto nos dentes anteriores, em função do tempo e do grande acúmulo de biofilme pela ausência de higiene bucal. Este quadro foi compatível com os altos níveis salivares de *S. mutans* observados entre as fases T0 a T12 do estudo.

6. 2 Infecção e colonização dos bebês por *S. mutans*

A boca de um bebê edêntulo apresenta superfícies mucosas expostas ao fluxo de saliva. *S. mutans* podem ser detectados em amostras de mucosa ou saliva de indivíduos edêntulos (GIBBONS, 1984). Alguns demonstraram que estes microrganismos se aderem a obturadores acrílicos de fenda palatina (BERKOWITZ *et al.*, 1975a). Entretanto, a maioria dos estudos indica que *S. mutans* são detectados a partir da erupção dos dentes (Berkowitz *et al.*, 1975b;

CAUFIELD *et al.*, 1993, Smith *et al.*, 1993). Por outro lado, diversos relatos posteriores mostraram a detecção de *S. mutans* em crianças edêntulas. Wan *et al.*, (2001a) confirmaram a presença da infecção por *S. mutans* em um terço de uma amostra de 188 bebês de três meses de idade dentre as quais, 55% (103/188) apresentavam nódulos de *Bohn*. Foi utilizada a técnica de cultivo em agar TYCSB (extrato de levedura com triptona adicionado de cisteína, sacarose e bacitracina). Os nódulos de *Bohn* são alterações benignas, micro-ceratocistos ou inclusões císticas, encontradas nos lactantes, que propiciam um local de aderência de microrganismos, uma vez que são recobertos por epitélio com baixa taxa de descamação celular. A análise de risco neste trabalho indicou que a presença destes nódulos aumentou em sete vezes a chance da colonização por *S. mutans* neste grupo (n=103).

Outros autores detectaram *S. mutans* em crianças de 2-6 meses de idade, antes da irrupção dentária (EDWARDSSON & MEJARE, 1978; MILGRON *et al.*, 2000; TANNER *et al.*, 2002a). Além disso, bebês com 12 meses já apresentam cárie dental, o que sugere o estabelecimento mais precoce de *S. mutans*. Existe um considerável interesse em determinar a época de colonização bucal por *S. mutans* em crianças já que estudos indicam que as intervenções antes do estabelecimento destes microrganismos são mais efetivas, sendo muito difícil a reversão de quadros severos de infecção por estes microrganismos (KÖHLER *et al.*, 1988). Sabe-se ainda que o estabelecimento precoce de *S. mutans* está relacionado ao maior risco de cárie durante a infância (KÖHLER *et al.*, 1988; MATTOS-GRANER *et al.*, 1988; WAN *et al.*, 2001a).

O dorso da língua parece também representar um importante reservatório de microrganismos potencialmente patogênicos (MILGRON *et al.*, 2000; TANNER *et al.*, 2002a). TANNER *et al.* (2002a), usando sondas de DNA, relataram que *S. mutans* estiveram presentes em 55% das amostras de placa dental e 70% das amostras de raspados de língua de 57 crianças entre seis e dezoito meses de idade. KREULEN *et al.* (1997) anteriormente, observaram tipos

clonais presentes na língua, sendo estes relacionados aos encontrados na saliva e no biofilme dental de crianças em fase pré-escolar e com cárie de mamadeira.

No presente trabalho também foram detectados *S. mutans* em duas crianças edêntulas de 10 e 11 meses de idade (com 4 e 8 ufc/área). Entretanto, *S. mutans* foram novamente detectados apenas em uma destas crianças seis meses depois, na fase T6, e em baixíssimos níveis (4 ufc). Isto sugere que estas crianças estavam expostas a estes microrganismos, porém não ainda colonizadas. Por outro lado, as recentes técnicas moleculares utilizadas para amostragens salivares em outros estudos (TANNER *et al.*, 2002a, b), apresentam maior sensibilidade na detecção microbiana que as técnicas de cultura.

WAN *et al.* (2001b) descreveram que crianças edêntulas com níveis detectáveis de *S. mutans* normalmente pertenciam a famílias com hábitos que favoreciam a transmissão de microrganismos tais quais os contatos freqüentes com a saliva de adultos, através da partilha de alimentos e utensílios.

A proliferação de *S. mutans* na cavidade bucal sofre influência de propriedades bacterianas e fatores biológicos do hospedeiro, envolvendo saliva, erupção dentária e imunidade, além da composição da dieta e de outros fatores ambientais. Estes fatores, bem relacionados aos hábitos e estilo de vida, podem variar entre famílias e populações. Nesta população, as crianças ficavam dez horas por dia nos berçários das creches, com amplo e freqüente contato umas com as outras, e com as cuidadoras. Estas instituições são consideradas ambientes propícios à propagação de diversos agentes infecciosos, inclusive *S. mutans* (RAITIO *et al.*, 1995; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a; TANNER *et al.*, 2002b; TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002). Assim, exposição às novas fontes de microrganismos, com aumento de contatos sociais fora da família na população estudada, poderia contribuir para a transmissão de *S. mutans* por fontes não maternas ou não-familiares.

A análise prospectiva da população estudada revelou que níveis detectáveis de *S. mutans* podem ser observados a partir dos primeiros 6 meses de idade (5,6% das crianças entre 5 a 13 meses) e que a prevalência de *S. mutans*

aumentou durante os primeiros 6 meses de acompanhamento (15,6% das 141 crianças acompanhadas), atingindo uma prevalência de infecção de 32,1% em um ano, quando as crianças apresentaram idade entre 17 e 25 meses. Finalmente, ao término do estudo, 40,3% das 119 crianças apresentaram-se com *S. mutans* detectáveis (Tabela 1).

A ocorrência de detecção de *S. mutans* aumentou rapidamente entre 11 a 19 meses de idade (Figura 6) e/ou após a erupção de ao menos um primeiro molar decíduo, conforme se pode observar em T6, quando 86,4% das crianças do grupo *S. mutans* detectável, já apresentava pelo menos um molar erupcionado. Os molares apresentam superfícies maiores e fissuras favorecendo à colonização por *S. mutans*, quando comparadas às lisas. As variações mínima e máxima da aquisição inicial de *S. mutans* esteve entre 8 e 32 meses de idade durante todo estudo (n=60), porém a maior parte dos bebês (n=36; 60%) adquiriu *S. mutans* entre 17 e 22 meses de idade, correspondendo exatamente às fases T6 e T12 (média±dp:18,1± 3,3). A idade mediana de aquisição inicial de *S. mutans* foi de 21 meses (n=60). O primeiro quartil esteve em 19 meses e o terceiro quartil em 24 meses. Das 119 crianças acompanhadas durante dezoito meses, 63 permaneceram com níveis não detectáveis de *S. mutans*. Estes resultados indicam que a infecção na população brasileira aqui representada ocorre de forma um pouco mais precoce do que em outras populações estudadas anteriormente, onde as variações estiveram entre 19-31 meses de idade, com mediana de 26 meses (CAUFIELD *et al.*, 1993) ou na idade média de 24 meses, numa população de crianças atendidas em creches (TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002). Os resultados desta pesquisa demonstram uma menor prevalência de *S. mutans* quando comparados com estudos realizados na mesma população há cerca de 10 anos (MATTOS-GRANER *et al.*, 1998), mas são compatíveis com dados de uma amostra de dezesseis crianças de estudo mais recente realizado na mesma população (KLEIN *et al.*, 2004).

Uma vez os *S. mutans* tenham sido detectados pelo cultivo, estes microrganismos estiveram presentes em amostras subseqüentes e usualmente

em números iguais ou mais altos, salvo as exceções do início do estudo (de T0 para T6). Uma razão seria o favorecimento do estabelecimento de *S. mutans* com o aumento de superfícies dentárias . Outro fator que poderia favorecer a proliferação de *S. mutans* com a idade seriam as mudanças de hábitos dietéticos com a inclusão de alimentação sólida associada à freqüente ingestão de sacarose. WAN *et al.* (2001b) relataram que as crianças infectadas por *S. mutans* consumiam o dobro da sacarose das crianças não infectadas, principalmente através de líquidos ricos em sacarose oferecidos durante a noite. No presente estudo, pôde-se observar que 25% do grupo de crianças utilizando mamadeira noturna com sacarose foram positivas para *S. mutans* entre T0 e T6, enquanto que as que utilizavam mamadeira sem o carboidrato, apenas 12,1% demonstraram níveis detectáveis para *S. mutans* nestas fases (Tabela 4). Foi observada uma associação significativa entre a utilização de mamadeira noturna com açúcar e a detecção precoce de *S. mutans*.

A sacarose facilita a aderência de *S. mutans*, pois a partir dela, *S. mutans* produzem polissacarídeos extracelulares insolúveis em água, essenciais para o seu acúmulo nas superfícies dentárias (MATTOS-GRANER *et al.*, 2000). Entretanto, outros fatores podem interferir no estabelecimento de *S. mutans*, como por exemplo, fatores imunológicos (NOGUEIRA *et al.*, 2005, SMITH *et al.*, 1998). Estudos anteriores demonstram que ocorrem grandes flutuações nos níveis de *S. mutans* durante os primeiros 3 anos de idade (SMITH *et al.*, 1993, MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a). No presente estudo, também verificamos que algumas crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* não demonstraram infecção por estes microrganismos em visitas subseqüentes. Estes casos consistiram de seis crianças de T0 para T6; cinco crianças de T6 para T12 e quatro crianças de T12 para T18. Os resultados refletem provavelmente a afirmação de que a microbiota da criança é instável nos primeiros anos, especialmente em termos de ecologia de *S. mutans* e diferente da microbiota estável e persistente dos adultos (REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; ESIN *et al.*, 2005). Além disto, a própria

sensibilidade do método de cultivo pode estar relacionada, em parte a estas flutuações (DASANAYAKE *et al.*, 1995).

Os níveis encontrados também variaram, entretanto normalmente concentrações salivares de *S. mutans* mais altas foram observadas no acompanhamento. Especialmente, o nível mais alto, ≥ 100 ufc, esteve presente em 16% das crianças avaliadas em T18 (Figura 6). Sabe-se que uma vez estabelecidos em altos níveis na cavidade bucal, há um alto risco de desenvolvimento de lesões de cárie em idades subseqüentes (ALALUUSUA *et al.*, 1996; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a). Crianças colonizadas por *S. mutans* em estágios precoces apresentam maior risco de desenvolver lesões de cárie. Aproximadamente, 90% dos bebês precocemente colonizados em torno dos dois anos desenvolveram lesões aos quatro anos de idade, no estudo Sueco de KÖHLER *et al.* (1988), e apresentaram dez vezes mais superfícies cariadas que àqueles que não estiveram colonizados naquela idade. Estas observações reforçam a importância da prevenção na colonização precoce por *S. mutans*, justificando esforços para selecionar crianças em risco microbiológico em idade precoce e para identificação de fontes de transmissão destes microrganismos. Neste estudo, como já citado, após 12 e 18 meses foram observadas diferenças significativas quanto à prevalência de lesões cavitadas quando comparados os grupos de crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* e sem níveis detectáveis de *S. mutans*. Estas diferenças foram significativas, conforme se pode observar na Tabela 1.

Fatores sócio-econômicos como relatados por ROSEMBLATT & ZARZAR (2004) influenciam a saúde bucal. WAN *et al.* (2001b) mostraram um comportamento negativo frente à saúde bucal dos bebês do grupo infectado, cujas mães possuíam um *status* de saúde bucal deficiente com acúmulo de placa, cálculo, escovando menos freqüentemente os dentes e possuindo baixo poder aquisitivo. A população das creches é de nível sócio-econômico desprivilegiado. De acordo com os cem questionários respondidos, a renda familiar média é de 2,7 salários mínimos e o total de 46% das mães das crianças relatou grau de

escolaridade inferior ao 2º grau completo. Apesar de durante o estudo não terem sido realizados exames clínicos nas 16 mães do subgrupo, os níveis salivares de *S. mutans* foram altos em 68,8% (n=11) delas, sugerindo a presença de fatores de risco para saúde bucal infantil dentro do ambiente familiar (Tabela 9).

6.3 Padrão de colonização dos bebês por amplitipos de *S. mutans*.

Neste estudo, os bebês apresentaram grande diversidade clonal de *S. mutans* ao longo das coletas, porém em cada coleta foi determinado um único clone na maior parte dos bebês (Tabelas 5 e 6). O número de genótipos identificados foi independente dos níveis de *S. mutans* detectados na saliva. A diversidade clonal variou de um a quatro amplitipos, porém apenas uma criança apresentou quatro amplitipos distintos. Este bebê saiu do estudo em T12, não podendo ser acompanhado. Cerca de trinta e oito por cento (n=12) dos amplitipos isolados de 22 crianças em T6 foram re-isolados após 6 meses (T12) e 25% (n=8) foram novamente isolados em T18 (Tabela 6), porém 75% (n=24) não puderam ser re-isolados de T6 para T18. Alguns bebês também adquiriram novos clones, conforme os exemplos ilustrados na Figura 8. Entre um total de 26 crianças com níveis detectáveis de *S. mutans* antes dos 21 meses de idade, cinco (23,8%) bebês que adquiriram um único clone de *S. mutans* antes dos 21 meses de idade, em T6, permaneceram com este mesmo amplitipo até T18, ou seja, os clones identificados em idade precoce mostraram “estabilidade” na cavidade bucal. Outros cinco bebês que apresentaram três amplitipos entre T6 e T12, mas não os conservaram até o final do estudo, foi identificado apenas um clone distinto do inicial, no acompanhamento. Apenas um destes bebês permaneceu com os três amplitipos identificados em T12, após seis meses. Na literatura, observam-se vários estudos demonstrando diversidade genotípica de isolados de *S. mutans* entre crianças da faixa etária de 5 a 36 meses e que variaram de um a cinco genótipos diferentes por criança (KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD & WALKER,

1989; ALALUUSUA *et al.*, 1996; KREULEN *et al.*, 1997; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999, GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a; TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002; KLEIN *et al.*, 2004). Segundo CAUFIELD & WALKER (1989), uma vez estabelecidas, as espécies bacterianas tendem a persistir na cavidade bucal. Os autores observaram a conservação de cepas em par mãe-bebês até após três anos de acompanhamento. Tem sido mostrado que amplitipos de *S. mutans* têm um grau de consistência em crianças de três a oito anos de idade, indicando a persistência ou “estabilidade” das cepas na cavidade bucal dos mesmos (REDMO EMANUELSSON & THORNQVIST, 2000). Por outro lado, há variações nas idades das crianças estudadas e o número de amplitipos identificados parece não estar relacionado com a idade ou níveis de infecção. Os números de cepas isoladas nos estudos são divergentes, variando de um a 45 isolados (LI & CAUFIELD, 1995; GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000; TEDJOSASONGKO & KOZAI, 2002; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 2003; KLEIN *et al.*, 2004; NAPIMOGA *et al.*, 2004; ESIN *et al.*, 2005). KLEIN *et al.*, (2004) observaram em estudo longitudinal em 16 bebês brasileiros que nem todos os amplitipos observados em nichos da cavidade bucal, como rodets gengivais, dorso de língua e biofilme dental, estiveram presentes na saliva dos mesmos. Assim, dentro dos 8 a 10 isolados por criança no presente trabalho, alguns amplitipos podem não ter sido encontrados em função dos baixos níveis na saliva, sendo indetectáveis pelo método de cultivo utilizado. Ou ainda, este resultado possa refletir a colonização transitória comum a alguns amplitipos, com capacidade de colonização e sobrevivência diversificadas, relacionados a variações nos seus fatores de virulência ou ação de fatores de defesa do hospedeiro (KÖHLER *et al.*, 1990; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; GRÖNROOS & ALALUUSUA, 2000; NAPIMOGA *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2005).

Estudos como o de Alaluusua *et al.* (1996) têm relacionado à cárie de mamadeira característica nos bebês com alta ingestão de sacarose com a maior diversidade clonal de *S. mutans*. Entretanto, KREULEN *et al.*, (1997) observaram

em uma amostra de bebês com cárie de mamadeira, de um centro de atendimento de Amsterdã, que crianças com cárie severa normalmente apresentam um único tipo clonal. Os autores discutem sobre a seleção de um clone único mais viável e virulento quando do desequilíbrio da microbiota bucal, possivelmente devido ao estresse ambiental causado pelos baixos pHs do biofilme. No nosso estudo, das 23 crianças com lesões cariosas cavitadas presentes aos dezoito meses de acompanhamento, 20 (87%) chegaram ao final com clone único. Isso ocorreu ou desde o início do estudo (55%; 11 crianças), ou mantiveram apenas o clone mais prevalente nas amostragens subsequêntes, quando dois ou três foram identificados em idade precoce (45%; 9 crianças). Ainda destas 23 crianças, apenas uma criança demonstrou variação do amplitipo isolado e outra se apresentou com níveis detectáveis de *S. mutans* apenas na última fase do estudo. NAPIMOGA *et al.*, (2004), ainda buscando correlacionar diversidade genética e a atividade de cárie em adultos jovens, utilizaram a técnica de AP-PCR com dois *primers*. Os resultados destes autores aplicaram-se aos de REDMO EMANUELSSON *et al.*, (2003), em pesquisa anterior com adultos de 25 anos; ambos observaram alta diversidade clonal em indivíduos cárie-ativos, quando comparados aos indivíduos livres de cárie. Outras pesquisas com isolados clínicos devem ser realizadas buscando avaliar se condições severas de cárie dental são capazes ou não de selecionar clones mais virulentos.

6. 4 Vias potenciais de transmissão de S. mutans: similaridade clonal

Na população deste estudo, muitas fontes potenciais de infecção de *S. mutans* estavam presentes. As crianças atendidas em creches públicas não apresentam contato em tempo integral com os familiares, especialmente com a mãe. O potencial de infecção por fontes não maternas de transmissão existe pelo contato prolongado com outras crianças, que muitas vezes compartilham brinquedos, mordedores e até mesmo chupetas durante as atividades diárias. O

rastreamento da transmissão horizontal de *S. mutans* foi realizado através da comparação dos perfis genotípicos de *S. mutans* (AP-PCR) entre crianças que freqüentavam a mesma creche e das mesmas crianças com as cuidadoras nas respectivas salas da creche. Como controle, foi selecionado um subgrupo de crianças com altos níveis de *S. mutans* em determinada fase do estudo, para se averiguar a fidelidade de transmissão vertical, mãe-criança.

Há diversas evidências de que as mães são as principais fontes de infecção de *S. mutans* (BERKOWITZ *et al.*, 1975; CAUFIELD *et al.*, 1993; LI & CAUFIELD, 1995). Recentemente, um estudo longitudinal com 16 pares mãe-bebê dentro da população das EMElS confirmaram este resultado, encontrando 81,25% de similaridade entre amplitipos maternos e dos bebês. Este mesmo estudo indicou, entretanto, que diversos amplitipos não identificados nas mães, foram capazes de serem identificados colonizando a cavidade bucal das crianças em idade precoce, sugerindo fontes alternativas de infecção (KLEIN *et al.*, 2004). O padrão de coincidência de genótipos de mães e crianças parece diferir entre crianças que permanecem em casa das crianças que permanecem nas creches. LI *et al.* (2000) observaram que um menor número de crianças de creches (44,7%) apresentam os mesmos amplitipos que as mães nas creches na China, quando comparadas com crianças que são mantidas no ambiente doméstico (LI & CAUFIELD, 1995). No estudo, LI *et al.* (2000) enfatizam o tempo de 8 horas por dia, cinco vezes por semana, que as crianças ficavam nas creches, enquanto as mães trabalhavam fora do ambiente doméstico. Crianças que freqüentam creches estão mais expostas a infecções cruzadas e à maior diversidade de clones de diversas bactérias que colonizam o trato respiratório como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae* (Yano *et al.*, 1999). Esta seria a possível explicação à maior diversidade de genótipos identificada nas populações atendidas em creches. No entanto, poucos estudos procuram rastrear vias não-familiares de infecção.

A despeito dos altos níveis bucais de *S. mutans* identificados em 68,8% das 16 mães avaliadas, a coincidência entre genótipos maternos e dos bebês

neste estudo foi de apenas 50% (oito casos) (Tabelas 9 e 10). Estes resultados são muito semelhantes aos encontrados em estudo realizado em creches por LI *et al.* (2000), no qual verificaram-se que apenas 44,7% das crianças de creches *S. mutans*-positivas apresentavam os mesmos genótipos das mães. Este mesmo grupo de pesquisadores havia descrito uma coincidência de genótipos em 71% dos pares de mães-filhos em uma população de crianças que permanecia no ambiente familiar (CAUFIELD *et al.*, 1995). Por outro lado, KLEIN *et al.* (2004) verificaram em uma amostra de 16 pares mãe-filhos que cerca de 81% das crianças albergavam o mesmo amplitipo identificado nas mães (KLEIN *et al.*, 2004). Diferenças na forma de recrutamento da amostra populacional podem ter contribuído para esta diferença. Estudos indicam que mães que amamentam seus filhos têm mais chances de transmitir genótipos de *S. mutans* mesmo em populações de creches (LI *et al.*, 2003). No presente estudo, verificamos que 25% das mães apresentaram um único amplitipo, sendo ele transmitido ao bebê, e este abrigando um ou mais amplitipos. Por outro lado, algumas mães que apresentavam muitos amplitipos, nenhum deles pôde ser detectado no bebê, mesmo ele abrigando mais que um clone (Tabela 10; Figuras 17 e 18). A média de clones detectados nas mães foi de 2,0 ($\pm 1,3$), enquanto a média de clones na cavidade bucal das crianças deste subgrupo foi de 1,3 ($\pm 0,68$). O número de clones compartilhados entre mães e filhos foi de apenas nove na amostra avaliada, enquanto foram identificados 33 genótipos nos perfis de AP-PCRs maternos.

Curiosamente, na criança “61” (Figura 17), que adquiriu *S. mutans* precocemente (T6; 13 meses) e manteve altos níveis (≥ 100 ufc) em todas as coletas, um único genótipo foi detectado ao longo do acompanhamento. Entretanto, o mesmo não teve origem materna. Esta criança apresentou muitas lesões de mba (18) e cavidades ativas (4) durante o estudo, em função da provável virulência desta cepa colonizadora. A frequência na ingestão de açúcar refinado na mamadeira durante a noite pode ter influenciado na seleção deste clone no biofilme dental do bebê. Não foi possível identificar a origem deste

amplitipo, pois nesta creche havia poucas crianças e nenhuma delas apresentou-se com níveis detectáveis de *S. mutans*. Tampouco houve coincidência com os tipos clonais das auxiliares de saúde, apesar do contato íntimo e freqüente. Ao contrário, o bebê “105” (Figura 18) que não apresentou lesões cariosas ao final do estudo apesar dos altos níveis de *S. mutans* detectados, adquiriu dois clones, sendo um de origem materna (Figura 18) e o outro cuja origem não foi determinada. Um segundo bebê nesta mesma creche – “108”, apresentou dois clones, sendo um parecido ao do bebê anterior, diferindo por duas bandas. O outro clone era similar ao da mãe e prevaleceu como único em T18. Esta criança também não apresentou lesões de cárie, apesar da colonização precoce aos dezoito meses, em T6.

Examinando-se *fingerprintings* de DNA de *S. mutans* em indivíduos não relacionados, autores descrevem que nunca dois isolados foram identificados como genotipicamente iguais, a menos que os indivíduos estejam inter-relacionados mostrando padrões exatamente idênticos (CAUFIELD, 1997). Portanto, uma “coincidência” genotípica reporta a transmissão de cepas entre indivíduos: mãe-filho, cônjuges e irmãos (KULKARNI *et al.*, 1989; REDMO EMANUELSSON *et al.*, 1998; KOZAI *et al.*, 1999). Dentre estes clones, alguns seriam mais aptos à se adaptar às condições ambientais presentes do que outros e, este fato explicaria por um lado porque alguns genótipos se estabelecem na cavidade bucal, enquanto outros são transitórios e, porque a experiência de cárie entre indivíduos infectados por *S. mutans* seria diferente.

A detecção de outras espécies de bactérias, inclusive periodonto patógenos fastidiosos, como *P. gingivalis* e *B. forsythus*, em bebês edêntulos foi possível em função das técnicas atuais com sondas de DNA e *Checkerboard* (KÖNÖNEN *et al.*, 1994; TANNER *et al.*, 2002b; YANG *et al.*, 2002). Além disso, foi determinada a similaridade da microbiota bucal infantil e a do seu primeiro “cuidador”, incluindo as mães (TANNER *et al.*, 2002b; YANG *et al.*, 2002). No estudo transversal, encontrou-se forte correlação entre as espécies presentes nos bebês com as espécies encontradas nos adultos (TANNER *et al.*, 2002b). Por

outro lado, o método da sonda de DNA não revela a transmissão das cepas específicas. LI & CAUFIELD (1998) demonstraram que a técnica de AP-PCR pode determinar ambos, homogeneidade e heterogeneidade (similaridade e dissimilaridade) entre amplitipos de *S. mutans* nos pares mãe-bebê. Muitos estudos mostram a fidelidade de transmissão de genótipos das mães para os filhos (CAUFIELD & WALKER, 1989; KULKARNI *et al.*, 1989; CAUFIELD *et al.*, 1993; LI & CAUFIELD, 1995; LI & CAUFIELD, 1998). No presente estudo, a reprodutibilidade da técnica de AP-PCR foi obtida executando alguns experimentos com no mínimo duas preparações diferentes de DNA, em dias diferentes. Padrões idênticos de amplitipos para cada cepa testada foram obtidos (dados não mostrados). O *primer* arbitrário OPA-02 foi escolhido nesta pesquisa por já ter sido demonstrado como o mais eficiente na diferenciação de genótipo de *S. mutans* entre um total de 40 *primers* arbitrários distintos, testados e comparados com padrões genéticos gerados por técnicas de restrição de DNA cromossomal (“gold standard”) (Li & CAUFIELD., 1998).

Dentre as 28 creches incluídas neste estudo, não foi possível fazer a comparação da similaridade das cepas criança-criança em todas creches, em função das perdas de acompanhamento da(s) criança(s) e/ou da não aquisição de *S. mutans* pelas mesmas presentes nas creches, durante o tempo de acompanhamento (T0 a T18). Apesar do número relativamente pequeno de crianças infectadas em cada creche durante o período de acompanhamento, foi possível identificar ao final do estudo, dezenove crianças representantes de oito creches que partilhavam amplitipos similares com o *primer* OPA-02. Após este *screening* inicial, as cepas similares e outras representativas dos bebês destas creches passaram por novos testes com o mesmo *primer*, e finalmente com outro *primer* (OPA-03), visando a confirmação dos resultados. Todas as cepas consideradas similares com OPA-02 foram também similares ou idênticas com OPA-03. Entretanto, OPA-03 falhou em discriminar cepas distintas de *S. mutans* em muitos casos (dados não mostrados), conforme citado por BARONE *et al.* (2005), em estudo com crianças portadoras da síndrome de *Down*. Os diversos

isolados de *S. mutans* comparados variaram entre creches e fases do estudo (Tabela 7; Figuras 13 e 14).

No presente estudo, as análises de similaridade dos amplitipos identificaram amplitipos que apresentavam entre 95 a 100% de similaridade com *primer* OPA02 sendo, portanto, considerados como o mesmo amplitipo. Assim, neste estudo longitudinal, diversas crianças compartilharam amplitipos dentro das creches, sugerindo transmissão horizontal criança-criança (Tabela 7). Alguns apresentaram índices de coincidência em torno de 100%, sendo idênticos (Figuras 9,10 e 11,12). As análises de similaridade foram altamente consistentes com as análises visuais realizadas em géis comparativos, onde os produtos dos amplitipos eram separados lado-a-lado. Entretanto, três amplitipos detectados como muito similares nas análises visuais dos géis de AP-PCR, com ambos *primers*, não foram considerados representativos da transmissão clonal entre bebês, por apresentarem coeficientes de similaridade *Dice* inferiores a 95% (dados não mostrados). A análise destas cepas através da técnica “gold standard” de análise do padrão de restrição do DNA cromossomal será, portanto necessária para esclarecer este resultado.

Pôde-se encontrar amplitipos compartilhados desde T0 até T18. Crianças em idade precoce e apenas com os incisivos inferiores erupcionados dividiram perfis similares com crianças gêmeas, em idade mais avançada. Os níveis de infecção por *S. mutans* na cavidade bucal, número de isolados, gênero e até a época de aquisição não influenciaram na determinação da transmissão entre os bebês. As crianças “81”, “95” e “66” apresentaram baixos níveis de infecção (1 a 3 ufc) determinados pela técnica de cultivo utilizada na pesquisa. Entretanto, apesar do pequeno número de isolados, os mesmos foram identificados como similares aos de outros bebês (“85”, “97” e “65”, respectivamente), indicando transmissão entre eles (Tabela 7). Para a criança “81”, além dos baixos níveis salivares de *S. mutans*, a frequência de detecção de *S. mutans* não foi contínua, o que pode demonstrar a presença da espécie de modo transitório. Entretanto, foi um clone originado provavelmente de criança “85”, que apresentou níveis mais

altos e lesões de cárie, apesar deste clone ter sido detectado na criança somente em T12 e T18. Um fato curioso foi que este bebê apresentou-se infectado por *S. mutans* no *baseline* (1 ufc), porém a cepa não foi recuperada, não sendo portanto, determinado o amplitipo do isolado. Esta criança era irmã gêmea da criança “84”, e compartilhava este mesmo genótipo, adquirido em época similar (T12; 22 meses de idade), o qual foi detectado como de origem materna. Interessantemente, estas meninas gêmeas apresentaram padrões idênticos das lesões de cárie durante o acompanhamento. A criança “26” parece ter adquirido em T18 um clone da colega “24”, pois esta última partilhava o mesmo genótipo com a mãe. Este estudo é compatível com o relato de um único caso de similaridade entre dois bebês, através de AP-PCR na mesma população, em creches públicas de Piracicaba (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). Naquele estudo, havia um baixo número de crianças de mesmas creches analisadas. Portanto, tornava-se necessário investigar a hipótese de transmissão horizontal de *S. mutans* nesta população em maiores detalhes.

Em 2002, TEDJOSASONGKO & KOZAI relataram a existência de seis crianças de creches no Japão compartilhando amplitipos de *S. mutans*. Por outro lado, estes autores relataram não terem encontrado homologia entre os clones dos bebês e dos “cuidadores” das creches, apesar do tempo de permanência de dez horas nas creches. Nesta pesquisa com a população brasileira, a comparação dos amplitipos de *S. mutans* dos bebês em todos os momentos de detecção com os amplitipos das auxiliares de saúde, determinados em momento único, foi realizada através de análise visual. Contrariando a hipótese de que a partilha de genótipos entre crianças poderia ocorrer através de uma fonte comum de transmissão (no caso, as cuidadoras), não foram observadas similaridades entre os amplitipos entre crianças e auxiliares de saúde (Figuras 15 e 16), apesar dos altos níveis salivares (51,5%) e da diversidade genotípica encontrada nas cuidadoras (Tabela 8). Todas as auxiliares de saúde presentes nas creches durante os 18 meses da pesquisa foram avaliadas com relação aos níveis de *S. mutans* na saliva, porém apenas aquelas presentes em creches com crianças com

níveis detectáveis de *S. mutans* tiveram a identificação genotípica realizada para comparação. O contato das cuidadoras com as crianças é freqüente e íntimo durante lanches, almoço, durante o banho e troca de fraldas. Entretanto, este contato varia entre creches e entre os bebês presentes. Um fato a ser citado que pode ter influenciado nos resultados foi o rodízio de algumas cuidadoras entre salas dentro da creche, uma vez por ano. Isso ocorre como rotina há alguns anos, devido a inadaptação da auxiliar àquela faixa etária ou, por necessidade em função do aumento do número de alunos. Assim sendo, em algumas ocasiões o contato da auxiliar com determinada criança foi interrompido, talvez antes do momento da aquisição de *S. mutans*.

O sucesso da colonização por *S. mutans*, provavelmente, requer exposições repetidas e hábitos que facilitem transferência de saliva de adultos para crianças ou, entre elas mesmas, tais como partilhar comida e utensílios e, hábitos envolvendo contactos salivares durante os períodos que dormem ou brincam juntas. O contato salivar pode ocorrer de forma indireta através de objetos colheres, chupetas, mordedores e brinquedos.

Além da freqüência do contato salivar, outros fatores podem favorecer a transmissão de *S. mutans* como a dieta. Até mesmo em bebês desdentados a alta exposição à sacarose, especialmente contida nas chupetas adoçadas esteve significativamente correlacionada à colonização por *S. mutans* (WAN *et al.*, 2001b). Em acréscimo, a importância da higienização regular na prevenção da infecção por *S. mutans* em bebês já foi demonstrada (WAN *et al.*, 2001b). Nas creches, além do consumo regular de sacarose presente em mingaus, sucos, “papinhas” e chás, a higiene através da limpeza dos dentes e/ou rodetes gengivais raramente fazia parte da rotina dos bebês antes dos dois anos de idade. WAN *et al.* (2001b) observaram que um alto percentual de crianças não infectadas por *S. mutans* (96%) tinham suas chupetas regularmente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,01%, quando comparadas às crianças infectadas (24%).

Novos amplitipos de *S. mutans* foram detectados nas crianças após a detecção inicial e, ao final do estudo. Algumas de origem materna (Tabela 10),

outras originadas da própria creche, com os coleguinhas de sala (Tabela 7). A transferência de clones entre bebês aqui pesquisados contou com uma dificuldade inerente que foi o baixo número de crianças na faixa etária estudada, por creche. Dentre as 28 creches municipais de Piracicaba, apenas dezesseis delas apresentavam quatro ou mais crianças no berçário ao início do estudo. Algumas delas saíram mesmo antes de estarem infectadas.

A frequência de contato com indivíduos infectados e os níveis de infecção dos potenciais agentes transmissores não são os únicos fatores que influenciam na transmissão e estabelecimento de *S. mutans* na cavidade bucal. Há indícios de que alguns clones de *S. mutans* podem ser colonizadores mais agressivos do que outros (GRONROOS *et al.*, 1998; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001b; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001c). Além disto, fatores do hospedeiro que influenciariam no estabelecimento de *S. mutans* parecem ser muito importantes. Analisando um subgrupo de crianças desta população quanto aos padrões de especificidade de IgA salivar à *S. mutans* nos momentos iniciais do estudo (T0 a T6), NOGUEIRA *et al.* (2005) observaram padrões intensos de resposta do anticorpo IgA a antígenos específicos deste microrganismo, envolvidos na virulência. Comparando o subgrupo de crianças infectadas com pares não infectadas, os autores observaram que, crianças não infectadas apresentavam altos níveis de imunoglobulina IgA específica ao antígeno GbpB (*Glucan binding protein B*), enquanto estes anticorpos eram pobremente detectados em crianças infectadas.

Não saberíamos relatar qual o grau de estabilidade das populações de *S. mutans* ou até do genoma de *S. mutans*. Polimorfismos determinados em alguns genótipos podem ocorrer, sugerindo rearranjos genéticos, deleções e inserções em uma frequência ainda não determinada. Através de muitas gerações de um clone em particular, mutações podem ocorrer em qualquer momento, desde mutações silenciosas até grandes alterações como aquisições em blocos de um plasmídeo ou transposons. No genoma da cepa *S. mutans* UA159, foram detectados transposons e elementos de inserção (IS), semelhantes a outras

espécies relacionadas, como *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis* (AJDIC *et al.*, 2002). Assim, diversas modificações genômicas podem ocorrer através da troca horizontal de material genético, ocorrência de mutações e alterações mediadas por elementos móveis. A grande diversidade de *S. mutans* encontrada em idade precoce neste estudo, associada com os dados de partilha de amplitipos entre crianças da mesma creche enfatizam a necessidade de se considerar fontes não maternas de infecção no estudo, e planejamento de métodos de controle de infecção por *S. mutans*. Estudos neste campo são importantes, uma vez que as crianças mantidas em creche representam grande parte das crianças de baixo nível sócio-econômico e de maior risco ao desenvolvimento da doença cárie. Diversas características previamente descritas em populações destas EMEIs (MATTOS-GRANER *et al.*, 2001a,b; KLEIN *et al.*, 2004) poderiam ainda contribuir para maior possibilidade de transmissão não-materna e/ou não familiar. Os pequenos períodos de convívio materno incluindo-se os menores períodos de amamentação, consumo freqüente de sacarose nas refeições fornecidas nas creches e o contato prolongado entre crianças infectadas através da partilha de chupetas e brinquedos levados à boca são alguns exemplos.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que, na população estudada:

1. *S. mutans* são detectados a partir do primeiro ano de vida, sendo que amplitipos “estáveis” são detectados a partir dos onze meses de idade;
2. As crianças apresentam *S. mutans* em níveis detectáveis na cavidade bucal a partir de 8 a 32 meses de idade, sendo a idade mediana de aquisição inicial de *S. mutans* de 21 meses de idade;
3. Amplitipos de *S. mutans* identificados durante as fases iniciais de colonização bucal podem ser re-isolados em até um ano após sua detecção inicial, indicando o estabelecimento na cavidade bucal em idade precoce;
4. Bebês da mesma creche podem compartilhar amplitipos de *S. mutans*, os quais são re-isolados com o aumento da idade, indicando transmissão horizontal de *S. mutans* entre crianças que mantêm contatos freqüentes durante as fases iniciais de colonização bucal;
5. Não há transmissão de amplitipos de *S. mutans* entre crianças e respectivas cuidadoras das creches, a despeito dos altos níveis de infecção por *S. mutans* destas últimas;
6. Cerca de 50% das crianças infectadas por *S. mutans* apresentam clones de *S. mutans* não identificados em suas mães, indicando freqüente ocorrência de transmissão de *S. mutans* por fontes não-maternas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

1. AALTONEN, A. S.; TENOVUO, J. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. *Pediatr. Dent.*, v. 16, n. 2, p. 110-6, Mar./Apr. 1994.
2. AJDIC, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n. 22, p. 14434-39, Oct. 2002.
3. ALALUUSUA, S. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of Mutans Streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. *Archs. Oral Biol.*, v. 41, n. 2, p. 167-173, Feb. 1996.
4. ANSAI, T. *et al.* Influence of colonization with Mutans Streptococci on caries risk in Japanese preschool children: 24 month survival analysis. *Ped. Dent.*, v. 22, n. 5, p. 377-380, Sep./Oct. 2000.
5. BARONE, S.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Arbitrarily primed polymerase chain reaction for fingerprinting the genotype identification of mutans streptococci in children with Down syndrome. *Spec. Care Dentist.* v. 25, n. 1, p. 37-42, Jan./Feb. 2005.
6. BARROS, S. G. et al. Contribuição ao estudo da cárie dentária em crianças de 0-30 meses. *Pesq. Odontol. Bras.*, v. 15, n. 3, p. 215-222, jul./set. 2001.
7. BERKOWITZ, R. Etiology of nursing caries: a microbiologic perspective. v. 56, n. 1, p. 51-4, Spring. 1996.
8. BERKOWITZ, R. J. Acquisition and transmission of Mutans Streptococci. *CDA. J.*, v. 31, n. 2, p. 135-8. Feb. 2003a.
9. BERKOWITZ, R. J. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 69, n. 5, p. 304-7. May. 2003b.

¹ De acordo com a NBR-6023, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V.; WHITE, G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch. Oral Biol., v. 20, n. 3, p. 171-174, Mar. 1975a.
11. BERKOWITZ, R. J.; JORDAN, H. V. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Archs. Oral Biol., v. 20, n.11, p. 725-30, Nov. 1975b.
12. BONECKER, M. MARCENES, W. SHEIHAM, A. Caries reductions between 1995, 1997 and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. Int. J. Paediatr. Dent., v. 12, n. 3, p. 183-8, May 2002.
13. BOWEN, W.H. Response to Seow: Biological mechanisms of early childhood caries. Commun. Dent. Oral Epidemiol., v.26, suppl., p. 28-31, 1998.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação de Saúde Bucal – Brasília: Ministério da Saúde; 2004. 51 p. Série C. Projetos, Programas e Relatórios.
15. CARLSSON, J. et al. Early establishment of *S. salivarius* in the mouths of infants. J. Dent. Res., v. 49, n. 2, p. 415-18, Mar./Apr. 1970.
16. CATALANOTTO, F. A. et al. Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. J. Am. Dent. Assoc., v. 91, n. 3, p. 606-9, Sep. 1975.
17. CAUFIELD, P. W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. Ped. Dent., v. 19, n. 8, p. 491-498, Nov./Dec. 1997.
18. CAUFIELD, P. W. et al. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications for natural transmission. Infect. Immun., v. 56, n. 12, p. 3216-3220, Dec. 1988.

19. CAUFIELD, P. W., WALKER, T. M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. J. Clin. Microbiol., v. 27, n. 2, p. 274-278, Feb. 1989.
20. CAUFIELD, P. W., CUTTER, G. R., DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of Mutans Streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J. Dent. Res., v. 72, n. 1, p. 37-45, Jan. 1993.
21. CAUFIELD, P. W. *et al.* Natural history of *Streptococcus Sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. Infect Immun., v. 68, n. 7, p. 4118-23, July 2000.
22. DASANAYAKE, A. P. *et al.*, Distribution and determinants of mutans streptococci among African-American children and association with selected variables. Pediatr. Dent., v. 17, p. 192-198, 1995.
23. DAVEY, A. L., ROGERS, A.H. Multiple types of bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. Archs. Oral Biol., v. 29, n. 6, p. 453-460, June 1984.
24. ERSIN, N. K. *et al.* Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families. Oral Microbiol. Immunol., v. 19, n. 6, p. 408-410, Dec. 2004.
25. ESIN HAMES-KOCABAS, E. *et al.* Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. Microbiol. Res., v. 28, May 2006.
26. FREIRE, M. C. MELO, R. B., ALMEIDA E SILVA, S. Dental caries prevalence in relation to socioeconomic status of nursery school children in Goiânia-GO, Brazil. Community Dent. Oral Epidemiol., v. 24, n. 5, p. 357-61, Oct. 1996.
27. FUJIWARA, T. *et al.* Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2-year-old children of Japan. Community Dent. Oral Epidemiol., v. 19, n. 3, p. 151-4, June 1991.
28. GIBBONS R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J. Dent. Res., v. 63, n. 3, p. 378-385, Mar. 1984.

29. GOLD, O.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Archs. Oral Biol., v. 18, n. 11, p. 1357-1364, Nov. 1973.
30. GRÖNROOS, L. *et al.* Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. Infect. Immun., v. 66, n. 6, p. 2595-2600, June 1998.
31. GRÖNROOS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of Mutans Streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprint. Caries Res., v. 34, n. 6, p. 474-480, Nov./Dec. 2000.
32. KLEIN, M. *et al.* Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. J. Clin. Microbiol., v. 42, n. 10, p. 4620-4626, Oct. 2004.
33. KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. Scand. J. Dent. Res., v. 86, n. 1, p. 35-42, Jan. 1978.
34. KÖHLER, B., BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J. Clin. Microbiol., v. 9, n. 5, p. 584-588, May 1979.
35. KÖHLER, B. *et al.* Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. Archs Oral Biol., v. 28, n. 3, p. 225-231, Mar. 1983.
36. KÖHLER, B.; ANDRÉEN, I.; JONSSON, B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol. Immunol., v. 3, n.1, p. 14-17, Mar. 1988.
37. KÖHLER, B., KRASSE, B. Human strains of Mutans Streptococci show different cariogenic potential in hamster model. Oral Microbiol. Immunol., v. 5, n. 4, p. 177-180, Aug., 1990.
38. KÖHLER, B. *et al.* Longitudinal study of intrafamilial Mutans Streptococci ribotypes. Eur. J. Oral. Sci., v. 111, n. 5, p. 383-89, Oct. 2003.

39. KÖNÖNEN, E. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann. Med.*, v. 32, n. 2, p. 107-112, Mar. 2000.
40. KÖNÖNEN, E. *et al.* The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 9, n. 3, p. 136-141, June 1994.
41. KÖNÖNEN, E. *et al.* Establishment of oral anaerobes during the first year of life. *J. Dent. Res.*, v. 78, n. 10, p. 1634-39, Oct. 1999.
42. KOZAI, K. *et al.* Intrafamilial distribution of Mutans Streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. *Microbiol. Immunol.*, v. 43, n. 2, p. 99-106, 1999.
43. KREULEN, C. M. *et al.* *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC. J. Dent. Child.*, v. 64, n. 2, p. 107-10, Mar./Apr. 1997.
44. KULKARNI, G. V., CHAN, K. H., SANDHAM, H. J. An investigation into use of restriction endonuclease analysis for the study of transmission of mutans streptococci. *J. Dent. Res.*, v. 68, n. 7, p. 1155-1161, July 1989.
45. LEITE, I. C. G.; RIBEIRO, R. A. Dental caries in the primary dentition in a public nursery school children in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 16, n. 3, p. 717-722, jul/set. 2000.
46. LI, Y., CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of Mutans Streptococci by infants from their mothers. *J. Dent. Res.*, v. 74, n. 2, p. 681-685, Feb. 1995.
47. LI, Y., CAUFIELD, P. W. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprint for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 13, n. 1, p. 17-22, Feb. 1998.
48. LI, Y., *et al.* Colonization by Mutans Streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Archs. Oral Biol.*, v. 39, n. 12, p. 1057-62, Dec. 1994.
49. LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of Mutans Streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience

- among Chinese families. *Caries. Res.*, v. 34, n. 2, p. 123-32, Mar./Apr. 2000.
50. LI, Y. *et al.* Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 16, n. 1, p. 16-23, Feb. 2001.
 51. LI, Y. *et al.* Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J. Dent. Res.*, v. 84, n. 9, p. 806-811, Sep. 2005.
 52. LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec. 1986.
 53. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. *Community Dental Health.* v 13, n. 2, p. 96-8. June 1996.
 54. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. *Caries Res.*, v. 32, n. 5, p. 319-23, Sept./Oct. 1998.
 55. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Water-insoluble glucan synthesis by *Mutans Streptococcal* strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J. Dent. Res.*, v. 79, n. 6, p. 1371-1377, June 2000.
 56. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* *Mutans Streptococci* oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. *J. Pub. Health Dent.*, v. 61, n. 3, p. 161-167, Summer. 2001a.
 57. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Genotypic diversity of *Mutans Streptococci* in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 6, p. 2313-2316, June, 2001b.
 58. MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 11, p. 6931-41, 2001c.

59. MILGROM, P. *et al.* Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v. 28, n. 4, p. 295-306, Aug. 2000.
60. MORITA, M.C.; WALTER; L.R. F; GUILLAIN, M. Prévalence de la carie dentaire chez de enfants brésiliens de 0 à 36 mois. *J. d'Odontostomatol. Pédiatr.*, v. 3, n. 1, p. 19-28, mars 1993.
61. NAPIMOGA, M. H. *et al.* Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 697-703, 2004.
62. NOGUEIRA, R. D. *et al.* Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of a specific antigen recognition in infection. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 9, p. 5675-84, Sept. 2005.
63. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – World Health Organization – Oral Health Surveys: Basic Methods, 4th ed, p. 66, 1997.
64. O'SULLIVAN, D. M.; THIBODEAU, E. A. Caries experience and mutans streptococci as indicators of caries incidence. *Pediatr. Dent.* v. 18, n. 5, p. 371-4, Sep./Oct. 1996.
65. REDMO EMANUELSSON, I. LY; Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 13, n. 5, p. 271-277, Oct. 1998.
66. REDMO EMANUELSSON, I. WANG, X. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur. J. Oral Sci.*, v. 106, n. 3, p. 788-94, June. 1998.
67. REDMO EMANUELSSON, I., THORNQVIST, E. Genotypes of Mutans Streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res.*, v. 34, n. 2, p. 133-139, Mar./Apr. 2000.

68. REDMO EMANUELSSON, I. *et al.* Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 18, n. 1, p., 24-29, Feb. 2003.
69. RIBEIRO, N.M., RIBEIRO, M. A. Breastfeeding and early childhood caries: a critical review. *J. Pediatr.*, v. 80, n. 5 suppl., p. S199-S210. 2004.
70. ROGERS, A. H. Bacteriocin typing of *Streptococcus mutans* strains isolated from family groups. *Aust. Dent. J.*, v. 25, n. 5, p. 279-283, Oct. 1980.
71. ROSENBLATT, A.; ZARZAR, P. Breast-feeding and early childhood caries: an assessment among Brazilian infants. *Intern. J. Paediatr. Dent.*, v. 14, n. 6, p. 439-445, Nov. 2004.
72. SAARELA, M. *et al.* Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch. Oral Biol.*, v. 41, n. 8/9, p. 821-6, Aug./Sep. 1996.
73. SERWINT, J. R. *et al.* Child-rearing practices and nursing caries. *Pediatrics*, v. 92, n. 2, p. 233-237, Aug. 1993.
74. SMITH, D. J. *et al.* Salivary IgA antibody to oral streptococcal antigens in predentate infants. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 5, n. 2, p. 57-62, Apr. 1990.
75. SMITH, D. J. *et al.* Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 8, n. 1, p. 1-4, Feb. 1993.
76. SMITH, D. J. *et al.* Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial mutans streptococcal infection. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 13, n. 5, p. 278-285, Oct. 1998.
77. TANNER, A. C. R. *et al.* The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J. Dent. Res.*, v. 81, n. 1, p. 53-57, Jan. 2002a.
78. TANNER, A. C. R. *et al.* Similarity of the oral microbiota of pre-school children with that of their caregivers in a population-based study. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 17, n. 6, p. 379-387, Dec. 2002b.
79. TEDJOSASONGKO, U., KOZAI, K. Initial acquisition and transmission of Mutans Streptococci in children at day nursery. *ASDC. J. Dent. Child.*, v. 69, n. 3, p. 284-288, Sept./Dec. 2002.

80. THORILD, B.; LINDAU-JONSON, B.; TWETMAN, S. Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mothers and in their preschool children. Intern. J. Ped. Dent., v. 12, n. 1, p. 2-7, Jan. 2002.
81. TOMITA, N. E. *et al.* Prevalência de cárie dentária em crianças da faixa etária de 0 a 6 anos matriculadas em creches: importância de fatores socioeconômicos. Rev. Saúde Pública, v. 30, n. 5, p. 413-20, 1996.
82. Van HOUTE, J.; GREEN, D. B. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of teeth in humans. [Infect Immun.](#), v. 9, n. 4, p. 624-30, Apr. 1974.
83. WALTER, L.R.F., *et al.* Cárie em crianças de 0 a 30 meses de idade e sua relação com hábitos alimentares. Enc. Bras. Odontol., v. 5, n. 12, p. 129-36, 1987.
84. WAN, A.K.L. *et al.* Association of *Streptococcus mutans* infection and oral developmental nodules in pre-dentate infants. J. Dent. Res., v. 80, n. 10, p. 1945-48, Oct. 2001a.
85. WAN, A.K.L. *et al.* Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old predentate infants. J. Dent. Res., v. 80, n. 12, p. 2060-65, Dec. 2001b.
86. WAN, A.K.L. *et al.* A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. J. Dent. Res., v. 82, n. 7, p. 504-508, July. 2003.
87. WEINSTEIN, P. *et al.* Mexican-American parents with children at risk for baby bottle tooth decay: pilot study at a migrant farm-workers clinic. J. Dent. Child., v. 59, n. 5, p. 376-383, Sept./Oct. 1992.
88. WENDT, L. -K.; HALLONSTEIN, A. -L.; KOCH, G. Dental caries in a one and two-year-old children living in Sweden. Part I – a longitudinal study. Swed. Dent. J., v. 15, n. 1, p. 1-6, Jan. 1991.
89. YANG, E. Y. *et al.* Periodontal pathogen detection in gingival/tooth and tongue flora samples from 18- to 48-month-old children and periodontal status of their mothers. Oral Microbiol. Immunol., v. 17, n. 1, p. 55-59, Feb. 2002.

90. YANO, H. et al. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of nasopharyngeal flora in children attending a day care center. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 2, p. 625-29, Feb. 2000.

APÊNDICE 1:



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Análise da resposta imunológica de crianças durante a colonização por Streptococcus mutans e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos

Analysis of the immune response of children during the Streptococcus

Mutans colonization and of the molecular-genetic mechanisms involved in the biofilm formation by these microorganisms

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dr. Renata O. Mattos Graner

RG:19626648-8

CPF:175752488 62

Endereço: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Área de Microbiologia e Imunologia

Av. Limeira, 901

CEP 13414-018 Piracicaba, SP, Brasil

Telefone: 55 19 3412 5379

Fax: 55 19 3412 5218

Termo de informação e consentimento para a participação em pesquisa clínica

Título:

Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos.

Pesquisadores:

Renata de Oliveira Mattos-Graner
Alessandra Castro Alves
Maria do Rosário de O. Latorre
Ruchele Dias Nogueira
Daniel J. Smith

Este termo contém as informações sobre a pesquisa na qual você poderá participar. **Por favor, leia-o atentamente.** Qualquer dúvida que tiver, esclareça-a com a pesquisadora responsável, a qual estará a sua inteira disposição. Você deve decidir se deseja ou não participar desta pesquisa após entender todos os aspectos descritos a seguir, de modo que possa tomar uma decisão consciente.

1) Objetivo:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o potencial de resposta imunológica de crianças entre 6 e 24 meses de idade contra uma bactéria que causa a cárie dental, denominada *Streptococcus mutans*. Pretende-se também identificar possíveis fatores bacterianos relacionados com a capacidade destes microrganismos de se estabelecer na boca.

2) Justificativas:

A cárie dental é uma doença infecciosa, cujo tratamento sintomático restaurador é extremamente caro. A maior parte dos recursos públicos e privados ainda é aplicada em procedimentos curativo-restauradores e pouca ênfase é dada ao avanço de estratégias preventivas de controle desta doença. *Streptococcus mutans* são as principais bactérias envolvidos no desenvolvimento da cárie dental. Busca-se com este estudo compreender a participação de alguns destes fatores na capacidade destas bactérias de se acumularem nas superfícies dos dentes. Procura-se também avaliar a capacidade de defesa das crianças contra estas bactérias durante os processos de infecção. Assim, teremos maiores dados para o desenvolvimento de estratégias de controle de infecção que possam ser aplicados em programas de saúde pública.

3) Descrição da pesquisa:

Participarão deste trabalho 200 crianças com idade inicial de 6 meses, as quais serão acompanhadas até atingirem 24 meses de idade e as atendentes das crianças nas creches. As crianças serão submetidas ao exame bucal por um odontopediatra quando será feita a coleta de saliva com uma pipeta plástica descartável e esterilizada. As atendentes das crianças não serão examinadas e somente terão coletadas amostras bucais para detecção dos níveis de bactérias *Streptococcus mutans*. Estas amostras bucais para cultura bacteriana serão

coletadas com uma espátula de madeira esterilizada, a qual será introduzida na boca e girada até que umedecida com saliva. Este material será utilizado nesta pesquisa ou em pesquisas futuras relacionadas. As mães das crianças participantes também serão entrevistadas para a obtenção de informações adicionais sobre seus(uas) filhos(as). Serão coletadas amostras de saliva das agentes de saúde, responsáveis pelas crianças nas creches. A saliva será coletada utilizando uma espátula de madeira esterilizada, a qual será introduzida na boca do voluntário e girada até ficar umedecida com saliva, tal qual realizado na criança, conforme foi mencionado acima.

4) Desconfortos, riscos e benefícios esperados:

As crianças que participarem da pesquisa serão examinadas após escovação dental apenas com espelho intrabucal após a secagem com gaze dos dentes eventualmente presentes. A saliva para estudo microbiológico será coletada com uma espátula de madeira esterilizada e descartável, a qual será introduzida na boca até que umedecida com saliva, procedimento este que causa mínimo desconforto. Não existem riscos adicionais. As atendentes das creches somente serão submetidas ao mesmo exame microbiológico com espátulas de madeira. As mães serão entrevistadas nos dias que comparecerem para as reuniões de rotina das creches-escolas públicas em entrevistas com as próprias agentes de saúde destas instituições. Os benefícios serão os conhecimentos gerados por esta pesquisa e o diagnóstico precoce de possíveis problemas bucais, o qual será transmitido às mães e agentes de saúde.

5) Alternativas:

Não existem métodos alternativos para a obtenção das informações necessárias.

6) Exclusões:

Serão excluídas das pesquisas, as crianças com problemas de saúde geral ou sob antibioticoterapia até duas semanas antes do dia do exame.

7) Compensação:

Não há previsão de indenização ou ressarcimento, pois não existirão gastos ou riscos relacionados exclusivamente com a pesquisa.

8) Confidencialidade dos registros:

Você terá direito à privacidade, visto que todas as informações obtidas dos prontuários clínicos e laboratoriais permanecerão confidenciais nos âmbitos possíveis da lei, assegurando a proteção da sua imagem. Serão respeitados seus valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços serão feitos para protegê-lo, de ser identificado pessoalmente. Como participante desta pesquisa, você terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da comissão de ética responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, porém sua identidade não será divulgada.

9) Direito de participar, recusar ou sair:

Sua participação é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perdas de seus benefícios aos quais de outra forma tenha direito. Os pesquisadores terão o direito de desligá-lo do estudo a qualquer momento, se julgarem necessário. Ao participar, você concorda em cooperar com a pesquisa, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

10) Contatos:

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com o pesquisador responsável, Dra. Renata de O. Mattos-Graner (019) 3412 5287 e Profa. Sueli Aparecida de Araújo Pereira, responsável pelo projeto junto ao Setor de Saúde Escolar da Secretaria da Educação do município de Piracicaba pelo telefone (19) 3435 5555.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Tendo compreendido o termo de informação e consentimento para a participação da pesquisa clínica intitulada "**Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos**", concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores envolvidos para a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos.

Recebi uma cópia do termo de consentimento.

(Não assine este termo caso não tenha tido oportunidade de esclarecer suas dúvidas ou não tenha recebido respostas satisfatórias a todas elas).

Piracicaba, _____ de _____ de _____.

_____.

Assinatura do voluntário

RG:_____.

Dra. Renata de O. Mattos-Graner
Pesquisadora responsável
RG. 19626648-8

Profa. Sueli Aparecida de Araújo Pereira
Coordenadora do Programa de Educação e Saúde
Prefeitura de Piracicaba, SP
RG.6.612.768

APÊNDICE 2:

QUESTIONÁRIO

Creche: _____ Data: _____ N^o. ficha: _____

Nome da criança: _____ Data nasc.: _____

Nome da mãe: _____ Data nasc.: _____

1) Grau de instrução da mãe:

- 0. () sem instrução
- 1. () primeiro grau completo
- 2. () primeiro grau incompleto
- 3. () segundo grau completo
- 4. () segundo grau incompleto
- 5. () superior

2) Renda familiar: _____ reais

3) Perfil racial: Você se considera

- 1. () branco
- 2. () negro
- 3. () mulato
- 4. () amarelo
- 5. () índio
- 6. () outros _____

4) Qual o peso do seu (ua) filho (a) quando nasceu ? _____.

5) Amamenta ou amamentou seu filho ? () sim () não

6) Até que idade seu(ua) filho(a) mamou no peito ? _____.

7) Quantas vezes por dia seu filho é (foi) amamentado ? _____.

8) Durante a noite, você amamenta ou amamentava seu(ua) filho(a)

- 1. () nunca
- 2. () antes da hora de dormir
- 3. () várias vezes durante a noite. Quantas vezes por noite? _____.

9) Seu(ua) filho(a) toma mamadeira durante o dia ? () sim () não

10) Se não toma, até que idade (meses) tomou mamadeira durante o dia ?
_____.

11) Se ainda toma mamadeira, quantas vezes por dia? _____.

12) Qual a receita da mamadeira que seu filho toma durante o dia ?

_____.

13) Seu(ua) filho(a) toma mamadeira à noite ? () sim () não

14) Qual receita de mamadeira você oferece ao seu(ua) filho (a) a noite ???

_____.

15) À noite, seu(ua) filho(a) toma mamadeira:

a. () no colo, antes de dormir

b. () dorme com a mamadeira na cama

c. () acorda várias vezes à noite para receber a mamadeira que você oferece.

Quantas vezes por noite ? _____.

Qual a duração das mamadas ? _____.

16) Quando o seu filho (a) começou a comer comida salgada ? _____.

17) O que o seu(ua) filho(a) comeu ontem desde a hora que saiu da creche até hoje de manhã quando voltou ?

_____.

18) Seu(ua) filho(a) tem algum problema de saúde? () não () sim. Se sim, qual?

_____.

19) Seu(ua) filho(a) está tomando algum medicamento? () não () sim. Se sim, qual?

_____.

20) Seu(ua) filho(a) apresenta alguns dos seguintes problemas de saúde?

1. () asma

2. () pneumonia

3. () outros problemas respiratórios. Quais? _____

4. () Inflamação / dor de garganta (faringite)

5. () Inflamação do ouvido (otite)

6. () febre reumática

7. () desnutrição

8. () Doenças de infância (sarampo, catapora, rubéola)

9. () outros : _____.

21) Seu filho está tomando algum antibiótico ? Qual ? Há quanto tempo ? e quantas vezes por dia ?

22) Quais os medicamentos que seu(ua) filho(a) tomou? Por que ?

_____.

23) Qual a frequência de alguns desses sintomas para seu (ua) filho (a)?

1. Nariz escorrendo () nunca () algumas vezes () muito freqüente () todo tempo

2. Tosse () nunca () algumas vezes () muito freqüente () todo tempo

3. Nariz entupido/respira pela boca () nunca () algumas vezes () muito freqüente () todo tempo

4. Garganta inflamada () nunca () algumas vezes () muito freqüente () todo tempo

24) Seu(ua) filho(a) chupa chupeta ?

1. () não

2. () a toda hora

3. () às vezes. mais ou menos. Quantas vezes ao dia? _____.

4. () só para dormir

25) Seu(ua) filho(a) costuma morder ou chupar algum objeto além da chupeta?

1. () não

2. () sim. Qual objeto ? _____

com que frequência ? _____.

APÊNDICE 3:

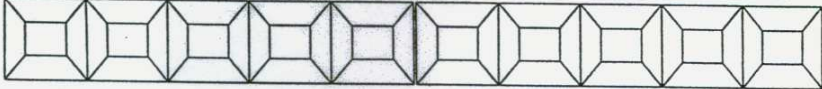
Nome: _____		Nº Ficha: _____		Nasc.: ____/____/____.	
Creche: _____		Sexo: (F) (M); Cor: (B) (N) (P) (A)			

Data do 1º Exame: ____/____/____. **Idade:** _____ meses

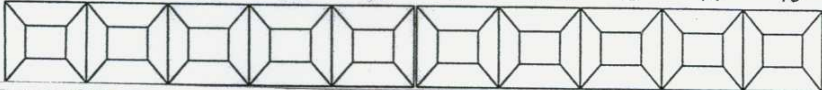
Está tomando medicamento (ou tomou nas últimas 4 semanas)? () sim () não

Qual? _____ Por que? _____ Chupeta na creche: (S) (N)

55545352516162636465



85848382817172737475

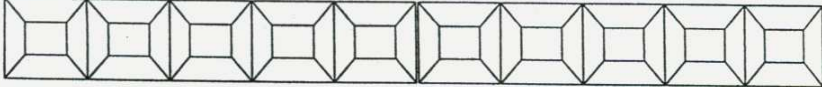


Data do 2º Exame: ____/____/____. **Idade:** _____ meses. () não realizou

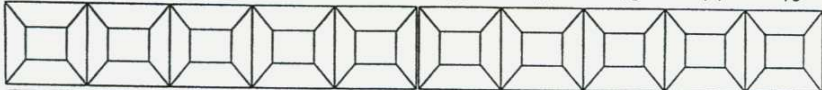
Está tomando medicamento (ou tomou nas últimas 4 semanas)? () sim () não

Qual? _____ Por que? _____ Chupeta na creche: (S) (N)

55545352516162636465



85848382817172737475

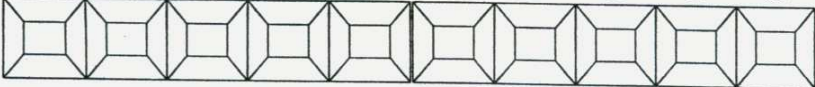


Data do 3º Exame: ____/____/____. **Idade:** _____ meses. () não realizou

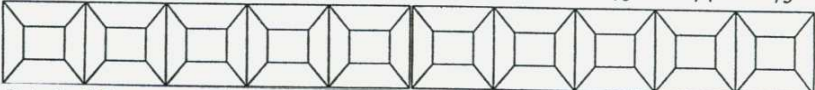
Está tomando medicamento (ou tomou nas últimas 4 semanas)? () sim () não

Qual? _____ Por que? _____ Chupeta na creche: (S) (N)

55545352516162636465



85848382817172737475

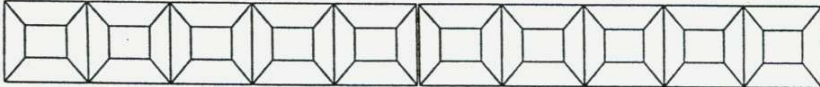


Data do 4º Exame: ____/____/____. **Idade:** _____ meses. () não realizou

Está tomando medicamento (ou tomou nas últimas 4 semanas)? () sim () não

Qual? _____ Por que? _____ Chupeta na creche: (S) (N)

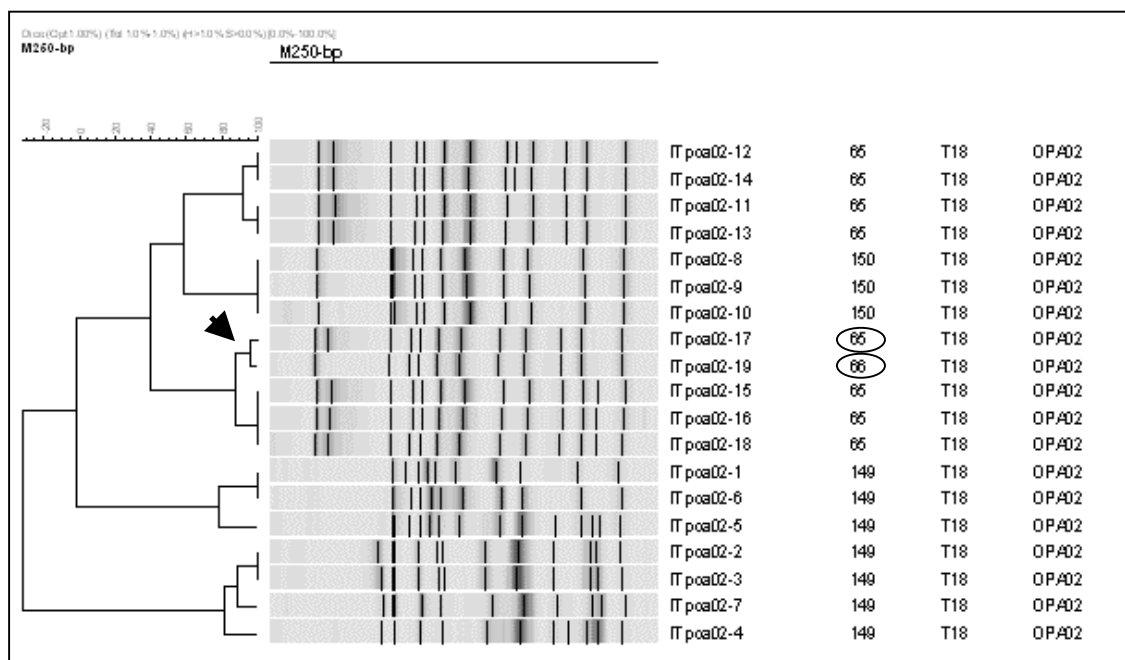
55545352516162636465



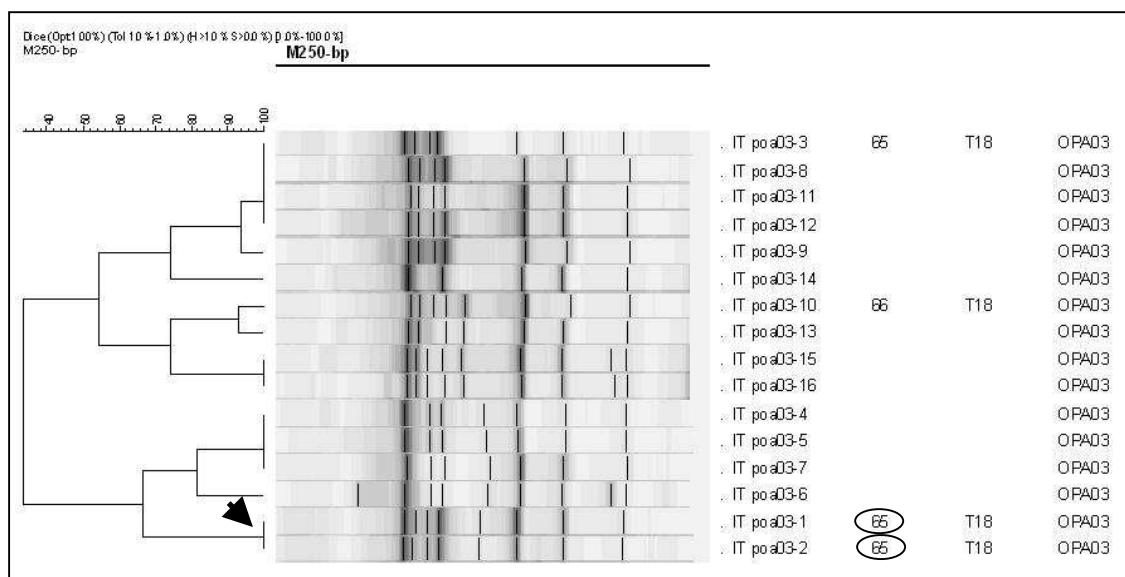
85848382817172737475



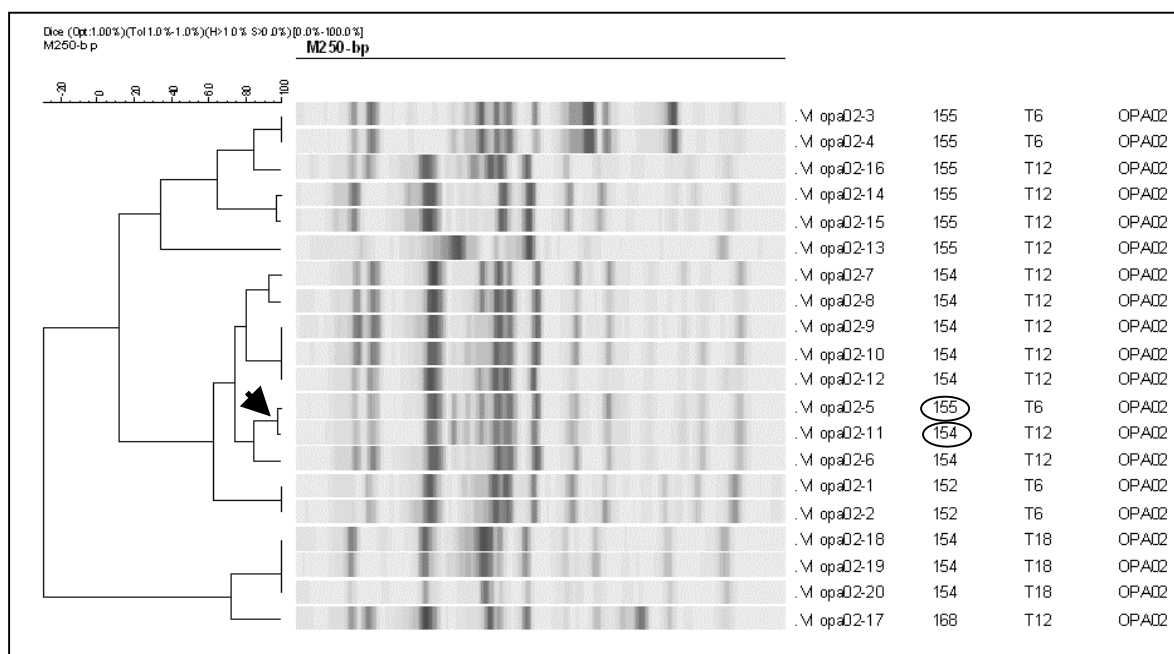
APÊNDICE 4:



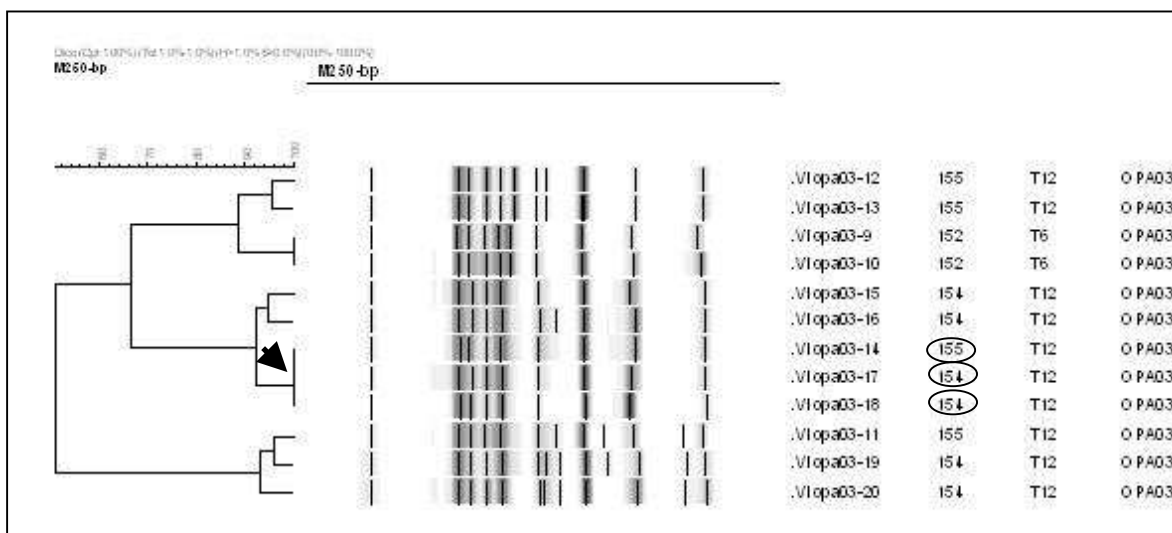
Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-02** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “65” e “66”, foram similares em > 95% (seta), isolados em mesmo tempo do estudo T18. Os demais amplitipos representativos dos demais bebês não foram similares (“149” e “150”).



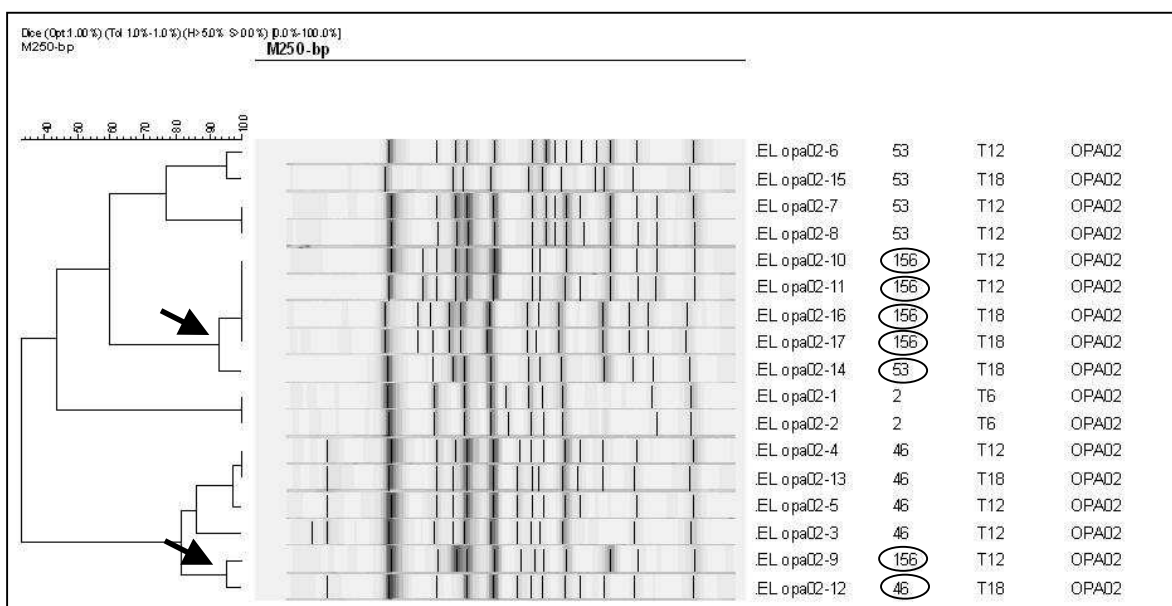
Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-03** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “65” e “66”, foram similares em 100% (seta), isolados em mesmo tempo do estudo T18.



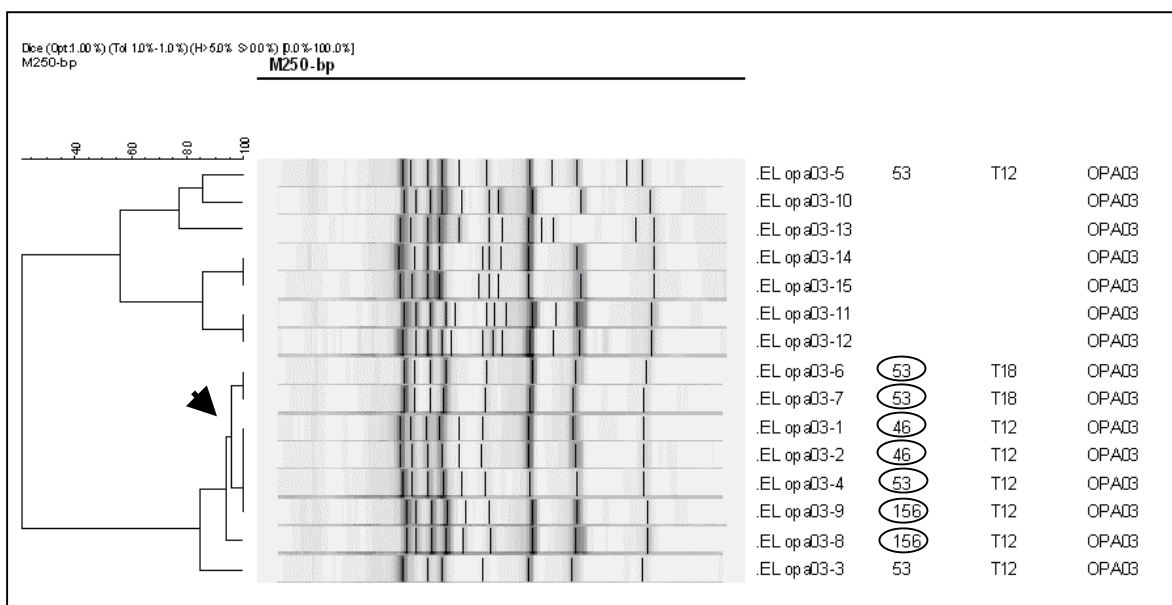
Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-02** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “155” e “154”, foram similares em > 95% (seta), isolados em tempos diferentes do estudo (T6 e T12). Os demais amplitipos representativos dos demais bebês não foram similares (“152” e “168”).



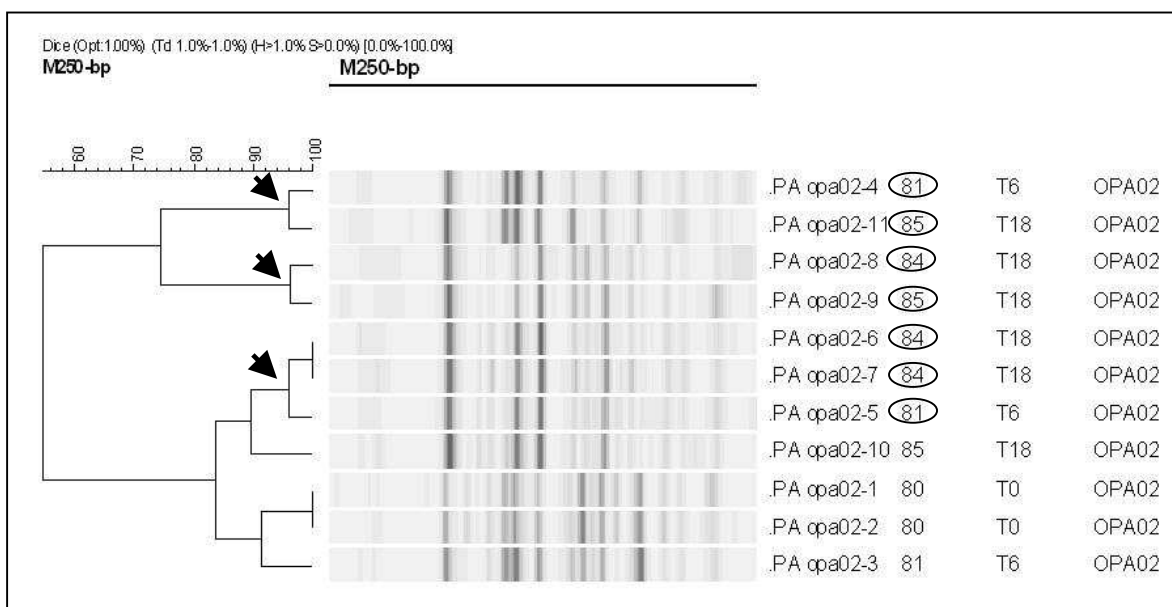
Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-03** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “155” e “154”, foram similares em 100% (seta).



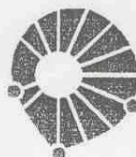
Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-02** em crianças de uma creche. Os amplitipos de dois bebês, “156” e “46”, foram similares em > 95% (seta), isolados em tempos diferentes do estudo (T12 e T18). E ainda, os clones “156” (T12 e T18) e “53” (T18) foram similares em > 95%.



Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-03** em crianças de uma creche. Os amplitipos dos bebês: “156” e “46” e “53” foram similares e agrupados em 100% e > 95% (seta), isolados nos tempos T12 e T18.



Dendrograma representativo de diferentes amplitipos de *S. mutans* com **OPA-02** em crianças de uma creche. Os amplitipos dos bebês: “81” (T6) e “85” (T18); “84” (T18) e “85” (T18); “84” (T18) e “81” (T6) foram similares e agrupados em similaridade > 95% (seta).



UNICAMP

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



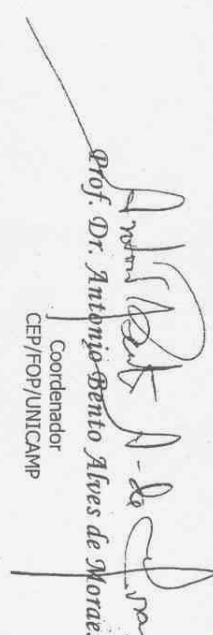
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise da resposta imunológica de crianças durante colonização por *Streptococcus mutans* e dos fatores genético-moleculares envolvidos na formação do biofilme dental por estes microrganismos", sob o protocolo nº **110/2002**, da Pesquisadora Responsável **Renata de Oliveira Mattos-Graner**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 26 de novembro de 2002

We certify that the research project with title "Analysis of the immune response of children during Streptococcus mutans colonization and of the molecular-genetic mechanisms involved in the biofilm formation by these microorganisms", protocol nº **110/2002**, by Researcher responsibility by **Renata de Oliveira Mattos-Graner**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, November 26 2002


Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Antônio Bento Alves de Moraes
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP