

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**

**Ocorrência de Microrganismos Oportunistas e Superinfectantes em
Crianças com 6, 12 e 18 Meses de Idade e suas Mães**

KARINA GERHARDT BIANCO

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha

Araçatuba

2009

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**

**Ocorrência de Microrganismos Oportunistas e Superinfectantes em
Crianças com 6, 12 e 18 Meses de Idade e suas Mães**

KARINA GERHARDT BIANCO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha

Araçatuba

2009

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B578o

Bianco, Karina Gerhardt

Ocorrência de microrganismos oportunistas e superinfetantes em crianças com 6, 12 e 18 meses de idade e suas mães / Karina Gerhardt Bianco. - Araçatuba : [s.n.], 2009

140 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009

Orientador: Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Coorientador: Prof. Robson Frederico Cunha

1. Reação em cadeia da polimerase
2. Epidemiologia
3. Odontopediatria

Black D27
CDD 617.645

DADOS CURRICULARES

KARINA GERHARDT BIANCO

Nascimento

01/03/1978 – Araçatuba - SP

Filiação

Roberto Silva Bianco
Márcia Gerhardt Bianco

1996 / 1999

Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Metodista de Piracicaba, UNIMEP – Campus Lins - SP

2001 / 2002

Curso de Especialização em Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

2003 / 2004

Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2006 / 2009

Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Pedro Ivo,

Você é muito mais do que pedi para mim. Meu ponto de apoio e de incentivo nos momentos mais difíceis que passei e por estar sempre disposto a me ajudar. Obrigada pela paciência que teve comigo em muitas ocasiões, pois sei que não foi fácil. Sei que estive ausente em muitos momentos e você soube entender isso com maestria, sempre me acolhendo em seus braços e fazendo com que a minha caminhada fosse bem mais leve. Que nossa sintonia nunca perca o tom, pois nossa união não pode ter sido por acaso neste mundo.

Te amo muito.....

Agradecimentos Especiais

A **Deus**, que na sua imensa bondade, sabedoria e misericórdia, nos agraciou com integridade física e moral, essenciais para me qualificar naquilo que sempre almejei.

Aos **meus Pais, Roberto e Márcia**, exemplos de amor, sabedoria, dedicação e honestidade, que sacrificaram suas vidas, não medindo esforços na minha formação moral e profissional.

Ao **meu irmão André e minha cunhada Cínthia**, pelo nosso amor incondicional e que mesmo estando longe fisicamente, estão sempre presente em meus pensamentos.

As **minhas avós Martha e Laís**, que me incentivaram desde criança e que vibram e oram para que minha caminhada seja tranqüila.

Aos **meus avôs Álvaro e Idemur (*in memorian*)**, que tenho certeza que estariam vibrando comigo mais esta conquista.

A **minha sogra Yorá**, por ter me dado o seu presente maior. Pelo carinho e preocupação sempre a mim dispensada.

Ao meu “**conhado**” **João Otávio**, aos **meus sobrinhos Paulo Octávio e Bianca**, que agora são minha família, pelos momentos de alegria e pela torcida para que tudo dê certo.

Aos **meus Familiares**, que mesmo à distância, torceram e vibraram com a minha vitória.

Agradecimentos

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP**, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé** e pela Vice Diretora Prof. **Dra. Ana Maria Pires Soubhia** pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Alberto, Célio, Robson, Dandinha, Sandra e Pitty**, que são exemplos de dedicação à docência, pela amizade, por todas as lições transmitidas e pela confiança em mim depositada.

Aos meus colegas e amigos de turma **Márcio Kadá, Ana Carolina Zaze, Karina Mirela Pinto, Karine Takahashi e Luciana Assunção** pelas trocas de conhecimentos e amizade sempre divertida.

A todos os **colegas e alunos do Programa de Mestrado e Doutorado em Odontopediatria**, pela amizade e pelo bom relacionamento durante o curso.

As alunas e estagiárias do Laboratório de Microbiologia **Ariane Jamile Gallo, Fernanda Cristina Sales Salineiro, Kathlenn Liezbeth Oliveira, Lívia Buzatti Meca, Marcelle Marie Buso Ramos e Vanessa Ferreira Silva**, muito obrigado pelo apoio e ajuda fundamental em vários momentos dentro do laboratório.

Em especial as estagiárias da Disciplina de Microbiologia **Marcelle Marie Buso Ramos**, pela ajuda essencial na parte experimental e a **Kathlenn Liezbeth Oliveira**, sempre disposta a ajudar, reconhecendo que parte deste trabalho árduo vem o aprendizado.

A colega de Doutorado, **Karine Takahashi**, pela essencial colaboração na fase clínica da tese, sou eternamente grata pela ajuda.

Aos **meus amigos e amigas do Departamento de Cirurgia**, pelos momentos de alegria, me acolhendo como se fosse parte integrante da equipe.

Aos meus **amigos que não são dentistas**, pelo grande incentivo e torcida.

A minha amiga querida de tantos anos, **Ana Carolina Almeida Prado Devides Alves**, por momentos tão especiais de descontração e pela ajuda profissional criteriosa na correção e tradução dos textos.

Aos amigos **Max Douglas** e **Karina Mirela** pela amizade sincera e fraternal, pelo delicioso café e pelos momentos de descontração e bate papo.

A querida **Rebeca**, que ultrapassou a simples convivência estudantil e tornou-se uma amiga para a vida toda.

A querida amiga **Cristiane Devollio Pizolito**, pela carinhosa ajuda no trabalho diário.

A professora **Christiane Marie Schweitzer** pela cuidadosa análise estatística.

Aos **amigos e funcionários** da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Mário Luis da Silva e Maria dos Santos Ferreira Fernandes** pela dedicação, amizade e ajuda a mim dispensada.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Ana Cláudia Grieger Manzatti, Ana Paula Rimoli de Oliveira, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Maciel Júnior, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luiz Cláudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez**, pela atenção, paciência e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos queridos amigos **Marina, Valéria e Diogo**, funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo profissionalismo, paciência e atenção.

As secretárias **Cleidinha (Cirurgia) e Mirian (Microbiologia)**, pela amizade que ultrapassou a esfera profissional, se tornando-se amigas muito queridas.

A **CAPES**, pela concessão do fomento durante parte da execução deste projeto.

Àqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigado...

Ao meu orientador Professor Elerson Gaetti Jardim Júnior,

Que me acompanha desde o mestrado, por sua mente brilhante, sempre inquieta e cheia de idéias, pela orientação a qual possibilitou a elaboração deste trabalho, pela ajuda e atenção a mim dispensada, ajudando na minha formação profissional...

Meus eternos agradecimentos.

Ao meu co orientador Professor Robson Frederico Cunha,

Pelo exemplo de dedicação ao ensino universitário, admirável pela humildade e desprendimento com que transmite os seus valiosos ensinamentos, não só os profissionais, mais os de vida também. Sei que em você tenho um amigo para a vida toda.

Meus eternos agradecimentos.

Resumo

RESUMO

BIANCO, KG. Ocorrência de Microrganismos Oportunistas e Superinfectantes em Crianças com 6, 12 e 18 Meses de Idade e suas Mães. 146 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

A primeira infância é a fase mais importante para o estabelecimento de condições de saúde, desenvolvimento da microbiota bucal e para o estabelecimento de hábitos. Desde que a grande maioria das infecções graves que acometem as crianças está associada a microrganismos superinfectantes e multirresistentes a antimicrobianos, cujo estabelecimento na cavidade bucal de bebês não é adequadamente descrito, foi objetivo do estudo, analisar a presença de um grupo desses microrganismos em crianças com seis meses de idade e suas mães, ao longo de doze meses de acompanhamento, bem como a presença de genes de resistência aos principais antimicrobianos nas amostras clínicas oriundas das mães e seus bebês. Para tanto, 68 pares de bebês e suas mães foram selecionados. Após levantamento de dieta dos bebês e das condições socioeconômicas das famílias, realizava-se a coleta de saliva e biofilme subgengival das mães e saliva das crianças, para avaliação microbiológica. Esses procedimentos foram repetidos, em todos os pares, quando os bebês completaram doze e dezoito meses de idade, acrescentando-se nessas ocasiões a coleta do biofilme dental das crianças. A detecção dos diferentes microrganismos oportunistas era realizada pela amplificação do DNA dos microrganismos alvo empregando-se as reações em cadeia da DNA polimerase (PCR). As condições de saúde da mucosa bucal e gengiva foram satisfatórias para os bebês, enquanto a maioria das mães era portadora de gengivite ou periodontite. Crianças cujas mães tinham gengivite mostraram maior frequência desses patógenos na saliva e no biofilme. Os principais microrganismos oportunistas detectados em mães e crianças foram os membros da família *Enterobacteriaceae*, além de *Enterococcus* spp., *E. faecalis*, *Helicobacter* spp. e *Helicobacter pylori*. Outros agentes infecciosos, como Citomegalovírus e vírus Epstein-Barr foram raramente detectados nas crianças, mas frequentes nas mães com inflamação periodontal, enquanto outros como o vírus do herpes simples tipo 1, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecium* e o complexo da *Burkholderia cepacia* foram raramente ou não foram detectados nas crianças e suas mães. Ao longo do período acompanhado, verificou-se um aumento modesto na prevalência desses microrganismos e vírus oportunistas, mas apenas o aumento na prevalência de CMV e EBV-1 nos bebês atingiu significância estatística. Em relação à presença de diferentes marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos, verificou-se que 69,1% das crianças estavam livres da presença dos principais genes de resistência, enquanto apenas 10,3% das mães estavam nessa condição, destacando-se a disseminação de genes de resistência à tetraciclina e β -lactâmicos.

Palavras Chave: Epidemiologia. Criança. PCR. Saliva.

Abstract

ABSTRACT

BIANCO, KG. Occurrence of opportunistic and superinfecting microorganisms in from children with 6, 12 and 18 months of age and their mothers. 2009.146 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Early childhood is the most important phase for the establishment of health conditions, development of oral microbiota and the establishment of habits. As the vast majority of infections that affect children is associated with superinfecting microorganisms and multi-resistant ones to antibiotics, whose establishment in the oral cavity of babies is not adequately described, the objective of this study was to analyze the presence of a group of these microorganisms in children aged six months of age and their mothers over twelve months of monitoring, as well as the presence of resistance genes to key antimicrobials in clinical samples derived from mothers and their babies. For this, 68 pairs of infants and their mothers were selected. After surveying the diet of babies and families' socioeconomic conditions, it was performed the collection of the mothers' saliva and subgingival biofilm and their children's saliva for microbiological evaluation. These procedures were repeated in all pairs, when babies completed twelve and eighteen months of age, adding on these occasions the collection of their dental biofilm. The detection of different opportunistic microorganisms was performed by amplification of target DNA of microorganisms through the chain reactions of DNA polymerase (PCR). Health conditions of oral mucosa and gingiva were satisfactory for the babies, while most of the mothers was a carrier of gingivitis or periodontitis. Children whose mothers had gingivitis showed increased frequency of these pathogens in saliva and biofilm. The main opportunistic microorganisms detected in mothers and children were members of the family *Enterobacteriaceae*, and *Enterococcus* spp., *E. faecalis*, *Helicobacter* spp. and *Helicobacter pylori*. Other infectious agents such as cytomegalovirus and Epstein-Barr virus were rarely detected in these children but common among the mothers with periodontal inflammation, while others such as herpes simplex virus type 1, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecium* and *Burkholderia cepacia* complex were rarely or were not detected in children and their mothers. Over the period monitored, there was a modest increase in prevalence of these opportunistic microorganisms and viruses, but only the increase in the prevalence of CMV and EBV-1 in babies reached statistical significance. Regarding the presence of different genetic markers of antimicrobial resistance, it was found that clinical samples of 69.1% of children were free of the presence of major resistance genes, while only samples from 10.3% of mothers were this condition, highlighting the spread of genes conferring resistance to tetracycline and β -lactams.

Keywords: Epidemiology. Child. Polymerase Chain Reaction. Saliva.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional para detecção de diferentes microrganismos por PCR convencional	36
Tabela 2	Iniciadores e temperatura de anelamento empregados no “nested” PCR para detecção de <i>Helicobacter</i> spp. e <i>H. pylori</i> , além dos vírus da família <i>Herpesviridae</i>	37
Tabela 3	Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para detecção de genes de resistência a tetraciclina, macrolídeos, lincosaminas, nitroimidazóis e aos β -lactâmicos	40
Tabela 4	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados, na saliva de bebês aos 6 meses de idade, além da saliva e biofilme de suas mães	49
Tabela 5	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva das mães e dos bebês aos 6 meses, em relação às condições periodontais das progenitoras	50
Tabela 6	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva e biofilme das mães dos bebês com 6 meses, em relação às condições periodontais das progenitoras	52
Tabela 7	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva e no biofilme de bebês aos 12 meses de idade e suas mães	58
Tabela 8	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva de bebês aos 12 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas	59
Tabela 9	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados no biofilme dental de bebês aos 12 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas	60
Tabela 10	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva e no biofilme de bebês aos 18 meses de idade e suas mães	66
Tabela 11	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva de bebês aos 18 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas	67
Tabela 12	Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados no biofilme de bebês aos 18 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas	68
Tabela 13	Prevalência de diferentes marcadores de resistência aos antimicrobianos em amostras de saliva e biofilme oriundas de mães e crianças	72
Tabela 14	Número de crianças e mães em que foram detectadas amostras (pelo menos uma amostra por indivíduo) de genes de resistência a antimicrobianos	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição das mães de acordo com a sua escolaridade	44
Gráfico 2	Porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, de acordo com a realização ou não de procedimentos de higiene pelas mães	46
Gráfico 3	Porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de amamentação ingerida	46
Gráfico 4	Categorização dos bebês examinados aos 6 meses de idade, de acordo com os tipos de hábitos alimentares noturnos. Valores expressos em percentagem	47
Gráfico 5	Número de dentes erupcionados nas crianças com 12 meses	53
Gráfico 6	Porcentagem de bebês avaliados aos 12 meses de idade, com relação à frequência de higienização bucal	54
Gráfico 7	Porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação à frequência de higienização bucal	62
Gráfico 8	Porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, quanto a prevalência de lesão de cárie dentária	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Ofício aprovação Comitê de Ética em Pesquisa	139
Anexo B	Questionário aplicado nas crianças	140
Anexo C	Questionário aplicado nas mães	144
Anexo D	Diário alimentar aplicado nos bebês	146

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Proposição	25
3	Material e Métodos	27
3.1	População estudada	27
3.2	Anamnese e exame clínico dos bebês aos 6,12 e 18 meses de idade	28
3.3	Anamnese e exame clínico das condições periodontais das mães	30
3.4	Levantamento da dieta alimentar das crianças aos 12 e 18 meses de idade	32
3.5	Coleta dos espécimes clínicos	32
3.6	Extração do DNA microbiano e determinação de sua concentração	33
3.7	Deteção por nested PCR e PCR convencional dos microrganismos alvo e víruses CMV, HSV-1 e EBV-1	34
3.8	Presença de diferentes marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos	38
3.9	Análise estatística	42
4	Resultados	44
	Resultados – 6 meses	44
	Resultados – 12 meses	53
	Resultados – 18 meses	61
5	Discussão	75
5.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	78
5.2	Pseudomonados	84
5.3	<i>Enterococcus</i>	86
5.4	<i>Helicobacteriaceae</i>	88
5.5	Complexo da <i>Burkholderia cepacia</i>	92
5.6	Citomegalovírus e Epstein Barr	94
5.7	Genes de Resistência	98
6	Conclusão	105
7	Referências	107
8	Anexos	139

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O conceito de assistência odontológica a crianças deve basear-se em uma interação entre os pais e o cirurgião-dentista. Esta assistência ocorre com o acompanhamento da criança em consultas sucessivas estabelecendo, desta forma, um relacionamento positivo com o profissional perdurando até a fase adulta. Desse modo, a odontologia para bebês firma-se como tendência na odontologia atual, sendo sua filosofia baseada principalmente em práticas educativas e preventivas, atuantes desde os primeiros meses de vida, com ações direcionadas para a determinação dos fatores de risco para as diferentes patologias bucais (CUNHA et al., 2000).

Por tratar-se a primeira infância como a fase mais importante para o estabelecimento da saúde bucal futura do indivíduo e, em função da erupção de seus primeiros dentes, observa-se nesta fase o desenvolvimento da microbiota bucal e o estabelecimento de hábitos de saúde bucal (FRISSE et al., 1998). Embora a quase totalidade da microbiota que se implanta na cavidade bucal seja constituída de microrganismos de baixa virulência e de comportamento anfibiótico (ALBANDAR;RAMS, 2002), a cavidade bucal da criança pode vir a receber, de diferentes fontes, microrganismos exógenos que podem se aproveitar que o processo de desenvolvimento da microbiota bucal é longo e complexo, e se instalar provisoriamente na cavidade bucal, principalmente no dorso de língua e sulco gengival, que oferecem alguma proteção contra o ambiente ao redor.

Em crianças e adultos imunocompetentes, esses patógenos normalmente não produzem quadros infecciosos, mas as condições orgânicas de um paciente, independentemente da idade, variam ao longo do tempo e podem ser influenciadas pela alimentação, higiene pessoal e bucal, estresse ambiental, medicamentos e outros fatores (KUNBAR et al., 2005). Nessas condições, essas infecções oportunistas podem ser causadas pela microbiota do próprio paciente ou por microrganismos

encontrados no ambiente em que o mesmo se encontra (MENEZES et al., 2007), que conseguiram se alojar no biofilme microbiano bucal (PANCHABHAI et al., 2009).

Diferentes microrganismos exógenos à cavidade bucal podem em função de desequilíbrio imunológico ou na microbiota autóctone bucal, se instalar no biofilme dental ou nas superfícies mucosas, convertendo esse ambiente em reservatório de espécies de importância médica, tais como *Helicobacter pylori*, normalmente associado às infecções gástricas, além de bactérias entéricas, freqüentemente encontradas em infecções graves originadas em ambiente hospitalar e em pacientes profundamente debilitados (DAHLÉN, 2009; QUIDING-JÄRBRINK et al. 2009).

O *Helicobacter pylori*, como citado acima, é o principal responsável pelo desenvolvimento das úlceras gástricas, mas a literatura sugere que o único local, fora da mucosa gástrica, que estes microrganismos colonizam é a cavidade bucal (GEBARA et al., 2004; RAJENDRAN et al., 2009), de forma que a aquisição desse microrganismo se daria na infância, quando a transmissão intrafamiliar é bastante relevante, possivelmente por contato oral-oral, gastro-oral e oro-fecal (NGUYEN et al, 1995).

Além desse aspecto, novas evidências sugerem que o biofilme bucal, que se estabelece precocemente na primeira infância, pode se tornar o principal reservatório de alguns desses microrganismos considerados patógenos clássicos, os quais geralmente possuem numerosos marcadores de resistência a drogas antimicrobianas, como os patógenos entéricos (GAETTI-JARDIM JR et al., 2007; GAETTI-JARDIM JR. et al., 2008) e pseudomonados.

Entretanto, não são conhecidos os fatores que possibilitam a transmissão desses microrganismos em crianças pequenas, tampouco a estabilidade dessa colonização bucal e a sua fonte de infecção, embora existam evidências de que a saliva é o principal veículo de transmissão e que fatores socioeconômicos podem interferir com a época de aquisição desses microrganismos (MALATY; GRAHAM,

1994), principalmente para os pseudomonados e microrganismos entéricos (BALTIMORE et al. 1989).

Dentre esses microrganismos oportunistas, bactérias como os membros da família *Enterobacteriaceae* se notabilizam por produzir infecções hospitalares graves e refratárias a antimicrobianos (AL-TAWFIC et al. 2009; GONÇALVES et al., 2007), intoxicações alimentares principalmente em crianças (SOLER et al., 2008), bem como infecções bucais em pacientes imunocomprometidos (BOTERO et al., 2007; DIS DIOS et al., 1993; GAETTI-JARDIM JR et al., 2008) e um possível envolvimento periodontal em pacientes com precárias condições de higiene (BARBOSA et al., 2001; SLOTS et al., 1991). Outros oportunistas, como *E. faecalis* e *E. faecium*, também estão associados a infecções multirresistentes e refratárias ao tratamento convencional, principalmente em endodontia (ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009), periodontia (BOTERO et al., 2007; SOUTO et al., 2006) e ambiente hospitalar (GONÇALVES et al., 2007), embora pouco conhecimento esteja disponível sobre a ocorrência desses cocos em infecções refratárias em dentes decíduos (COGULU et al, 2008).

Da mesma forma que os patógenos bacterianos têm chamado a atenção, os vírus herpéticos em geral e os vírus CMV e EBV (Citomegalovírus e Epstein-Barr), em particular, vêm ganhando destaque em função de suas capacidades de induzir alterações celulares e no sistema imunológico, de predispor à ocorrência de infecções bacterianas em indivíduos infectados, tanto por facilitar a exposição de novos receptores na superfície das células do hospedeiro, quanto por induzir a liberação precoce de IL-10 por monócitos, o que reduziria a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo II, associadas à apresentação de antígenos. A sua possibilidade de reduzir a atividade oxidativa de leucócitos e sua capacidade de fagocitose dos mesmos (MICHALOWICZ et al., 2000), além de induzir a liberação de IL-6 por fibroblastos e IL-1 β e TNF- α a partir de monócitos (MORGENSEN; PALUDAN, 2001; WARA-ASWAPATI et al., 2003), e a presença de outros peptídeos como importante atividade pró-inflamatória, que poderiam estar ligadas ao início da

periodontite (BOTERO et al., 2008; SLOTS et al., 2006). O vírus EBV, ainda apresenta capacidade de imortalização celular e sua associação com linfomas e carcinomas estão sendo avaliada. Além dessas peculiaridades, as infecções por esses vírus podem ser fatais para os pacientes que estão imunocomprometidos, inclusive para neonatos (RYAN;RAY, 2004)

A supressão da microbiota residente de boca pelo uso de antimicrobianos cria “janelas de infectividade” para microrganismos exógenos (FISHER;PHILLIPS, 2009; GAETTI-JARDIM JR et al., 2009; HELOVUO et al. 1993), facilitando sobremaneira a implantação dos mesmos na cavidade bucal.

Em anos recentes, as condições inflamatórias periodontais vêm sendo consideradas dentro de uma abrangência maior, uma vez que, do ponto de vista estatístico, as mesmas podem estar associadas a várias condições clínicas de interesse médico, como problemas reumáticos, infecciosos e respiratórios (BÁGYI et al., 2009; KIM;AMAR, 2006; WILLIAMS et al., 2008;). Entretanto, as periodontites estão associadas a uma microbiota com o predomínio de microrganismos Gram-negativos anaeróbios obrigatórios (HAFFAJEE et al., 2008) e, com exceção das infecções periodontais em pacientes com profunda imunossupressão (GAETTI-JARDIM JR. et al., 2008), microrganismos exógenos ao ambiente bucal não participariam da etiologia dessas doenças e alguns dados sugerem que os microrganismos bucais podem, inclusive exercer antagonismo sobre esses microrganismos oportunistas (GAETTI-JARDIM JR et al., 2008).

As doenças periodontais, apesar de serem diagnosticadas principalmente a partir da terceira década de vida, geralmente se iniciam muito tempo antes das primeiras manifestações clínicas aparecerem (LAMELL et al., 2000; LEVIN et al., 2006), sendo que a microbiota a elas associada se implanta nos primeiros meses e anos de vida (DOGAN et al., 2008; FRISKEN et al., 1990; OKADA et al., 2002) geralmente se disseminando a partir da mãe (DOGAN et al., 2008). Para outros microrganismos, como os superinfectantes e oportunistas citados acima, ainda

inexistem dados confiáveis sobre sua distribuição em crianças pequenas e como diferentes fatores podem interferir com sua transmissão.

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Assim, em vista da importância dos patógenos oportunistas como agentes de infecções graves e a possibilidade de transmissão desses microrganismos para crianças com poucos meses de vida, o presente estudo objetivou¹:

a) avaliar a frequência e detecção de um conjunto de microrganismos superinfetantes e oportunistas na cavidade bucal de crianças dos 6 aos 18 meses de vida e de suas mães;

b) avaliar a influência da dieta alimentar, fatores socioeconômicos, condições de higiene bucal sobre a ocorrência desses microrganismos;

c) verificar a presença de múltiplos marcadores de resistência a antimicrobianos nas amostras clínicas de saliva e biofilme obtidas de mães e crianças.

¹ Os ensaios referentes à microbiota residente da cavidade bucal de grande parte das crianças e suas mães foram realizados pela Dra. Karine Takahashi, sob orientação do Prof. Dr. Robson Frederico Cunha e Co-orientação do Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior e colaboração da Dra. Karina Gerhardt Bianco e os dados integrais podem ser consultados na tese de doutoramento intitulada “Avaliação da Microbiota Bucal de Bebês aos 6,12, 18 e 24 meses e sua relação com a dieta alimentar, condição gengival, erupção dentária e prevalência de cárie dentária”, defendida em 21 de agosto de 2009, junto ao Programa de Pós-graduação em Odontopediatria, FOA-UNESP.

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos a seguir passaram previamente pela aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA 2007/1796).

Como a filosofia do atendimento aos pacientes que ingressam no programa da Bebê Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP é preferencialmente educativa e preventiva, o primeiro passo foi a determinação dos critérios de inclusão e exclusão e a seleção dos pacientes que poderiam participar do estudo.

A seguir, procedeu-se o agendamento dos responsáveis pelas crianças para assistirem palestras sobre a importância do estabelecimento de hábitos adequados de higiene bucal, dieta, valorização dos dentes decíduos, cuidados necessários para a manutenção da saúde bucal e sobre o funcionamento da Bebê Clínica, dentre outros temas. Cumprida esta exigência, e de que a criança não tenha atingido 6 meses de idade (normalmente a Bebê Clínica aceita crianças com menos de um ano), o paciente passou a integrar o quadro de participantes do programa, sendo atendido com retornos bimestrais, permanecendo nesta rotina de atendimento periódico até completar 4 anos de idade, conforme descrito por Cunha et al.(2000).

3.1. População estudada

A população estudada foi composta, inicialmente, por 68 pares mães-crianças. Como critérios de inclusão e de exclusão, os bebês deveriam ter seis meses de idade e pertencer ao conjunto de pacientes ingressantes na Bebê Clínica, não deveriam ter recebido o uso de antimicrobianos nos 3 meses que precederem as coletas e tampouco apresentar enfermidades de saúde sistêmicas ou necessidades especiais e cujas mães concordaram em participar da pesquisa, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

Optou-se também por adicionar as mães das crianças estudadas, uma vez que, de maneira geral, os aspectos de dieta, higiene e, posteriormente, microbiota bucal, são dependentes, em grande parte, das condições das progenitoras. Assim, todas as mães das crianças selecionadas que participaram do estudo foram submetidas à avaliação clínica e forneceram espécimes clínicos para a avaliação da presença de microrganismos superinfectantes e oportunistas de forma análoga ao que também estava sendo realizado com os bebês.

Como critério de exclusão para as mães, também estava o uso de antimicrobianos ou compostos imunossupressores nos três meses que precederam a coleta de espécimes clínicos e tampouco deveriam ser portadoras de doenças sistêmicas ou necessidades especiais que pudessem influenciar no desenvolvimento de enfermidades infecciosas ou que viessem a requerer profilaxia antibiótica para a realização dos exames clínicos necessários. As mães deveriam ter um mínimo de 15 elementos dentais.

No estudo, foram selecionadas, inicialmente, 68 crianças e suas mães, mas algumas não puderam, por diversos motivos, continuar sua participação, reduzindo a amostra, após 12 meses, para 63 pares e, após 18 meses, para 56 pares de mães e bebês.

3.2. Anamnese e exame clínico dos bebês aos 6, 12 e 18 meses de idade

Em consultas agendadas, os bebês foram avaliados através de anamnese e exame clínico. A partir dos seis meses, durante a anamnese, através de questionário, as mães foram indagadas quanto ao tipo de alimentação, se amamentavam no peito ou mamadeira, ou, ainda, ambas as formas, e qual o conteúdo da mamadeira, frequência e existência de mamadas noturnas.

Como até a idade de seis meses recomendava-se que a criança fosse alimentada exclusivamente por leite materno, não foi aplicado diário alimentar nessa

fase inicial do trabalho, somente foi questionado se a criança fazia ingestão de outros alimentos.

Em todas as fases da pesquisa, as mães foram argüidas com relação ao uso de medicamentos e se seus infantes possuíam algum problema de saúde que necessitasse de medicação diária ou uso de antibióticos ou quimioterápicos com atividade antimicrobiana, também quanto aos hábitos de higiene bucal, particularmente no que concerne a participação materna, a freqüência de realização e o tipo.

No exame clínico, o qual era realizado após a coleta de saliva para avaliação microbiológica, foram avaliadas a condição gengival, a presença de dentes e a ocorrência de cárie dentária. A higiene bucal foi realizada com auxílio de gaze embebida em água oxigenada 10 volumes diluída em água filtrada. Seguiu-se então a realização do exame clínico em macri (maca para criança), com auxílio de refletor de luz, seringa de ar e espelho clínico.

Nas crianças de até seis meses de idade, as condições dos tecidos moles e roletes gengivais eram avaliadas. Como nessa fase do desenvolvimento crânio-facial, os elementos dentais decíduos estão irrompendo no ambiente bucal, de forma que a profundidade clínica do sulco gengival apresenta grande variação de normalidade, além da irritabilidade e choro característico da faixa etária, optou-se pela realização de exame periodontal sem a utilização de sondas periodontais, baseando-se o diagnóstico pela presença ou ausência de inflamação gengival, presença de cálculo dentário, coloração, textura e sangramento gengival. Foram observadas as faces mesio vestibular, vestibular, disto vestibular, mesio lingual, lingual e disto lingual de todos os dentes presentes.

No exame clínico dos bebês com 12 e 18 meses, foram determinadas as condições de higiene bucal das crianças baseadas nos valores obtidos com o índice de higiene oral de O'Leary et al. (1972), com utilização de solução evidenciadora de

placa bacteriana Replak® Dentsply, a qual não apresenta atividade antimicrobiana significativa.

Os dentes presentes foram anotados e a condição clínica dos mesmos foi avaliada segundo os critérios de Melhado (2003) com seus respectivos códigos:

- dente hígido (H): dente apresentava-se livre de cárie dentária;
- cárie em esmalte sem cavitação (CESC): pelo menos uma das superfícies apresentando lesão de mancha branca em decorrência da desmineralização do esmalte;
- cárie em esmalte com cavitação (CECC); pelo menos uma das superfícies apresentando lesão cariosa cavitada em esmalte;
- cárie em dentina (CDEN): pelo menos uma das superfícies apresentando lesão cariosa cavitada em dentina.

3.3. Anamnese e exame clínico das condições periodontais das mães

Dentre o grupo de pares de mães e bebês selecionados, todas as mães dispunham na cavidade oral pelo menos 15 elementos dentais. Os exames clínicos periodontais foram realizados por um único examinador previamente treinado e calibrado utilizando-se os critérios do *Periodontal Screening and Recording* (PSR). Para a realização do exame bucal, utilizaram-se instrumentos odontológicos rotineiros, como espelho bucal plano nº 05, pinça para algodão (Quinelato®) e sondas periodontais milimetradas tipo Williams (Duflex®).

A sonda foi introduzida no sulco gengival, de forma delicada, não agredindo mecanicamente o mesmo, e posicionada ao longo eixo do dente percorrendo todas as faces selecionadas dos elementos dentais presentes em cada indivíduo. A cavidade bucal do mesmo foi dividida em seis sextantes, como preconizada na metodologia. De posse dos valores obtidos, foi selecionado o maior escore e, se ausente, foi registrado com X.

Os escores foram descritos como apresentado empregando o Código 0 para pacientes com ausência total de bolsa periodontal, sem sangramento à sondagem, ausência de cálculo e excessos de margens restauradoras. O Código 1 era utilizado em pacientes que apresentavam ausência de bolsa periodontal, embora com presença de sangramento à sondagem, associado à ausência de cálculo e excessos nas margens das restaurações. Utilizou-se o Código 2 para os dentes com ausência de bolsa periodontal, sangramento à sondagem, presença de cálculo supra e/ou subgingival e/ou excessos nas margens de restaurações. O Código 3 foi utilizado quando ocorria a presença de bolsa periodontal de 3,5 a 5,5 mm, necessitando de um exame periodontal complementar e abordagem profissional para tratamento da periodontopatia. Por fim, o Código 4 foi utilizado para a presença de bolsa periodontal acima de 5,5mm, o qual, por ser considerado periodontite avançada, havia necessidade da realização de exame periodontal avançado de toda a arcada dentária e medida de tratamento eficaz (VAN DER WELDEN et al., 2006).

Como descrito acima, a utilização do Código (*) no sextante descrevia a presença de problemas periodontais severos, tais como mobilidade periodontal grau 2 e 3, exposição e/ou envolvimento de furca e perda de gengiva inserida, causando retração gengival com medida maior que 3,5mm. Os dados coletados eram registrados em ficha apropriada, segundo recomendação da *American Dental Association* e *American Association of Periodontology*.

Os indivíduos diagnosticados com os maiores códigos (3 e 4) receberam exame periodontal detalhado, considerando o índice de sangramento gengival (AINAMO;BAY, 1975), a presença de cálculo supragengival, a determinação da profundidade clínica de sondagem e o nível clínico de inserção (RAMFJORD, 1959) e o índice de higiene oral (O'LEARY et al., 1972), com utilização de solução evidenciadora de placa bacteriana Replak® Dentsply, a qual não apresenta atividade antimicrobiana.

3.4 Levantamento da dieta alimentar das crianças aos 12 e 18 meses de idade

Para a aquisição de dados referentes à dieta das crianças, no que diz respeito à quantidade, frequência e composição da dieta ingerida, foi elaborado um diário alimentar, baseado no formato preconizado por Thylstrup e Fejerskov (2001).

Foi solicitada às mães a descrição da alimentação oferecida à criança nos 7 dias que precederam a consulta para coleta dos substratos. Com base nos dados obtidos com o recebimento desses diários alimentares, os quais foram analisados para que se relacionasse o padrão de consumo de alimentos cariogênicos, esses achados foram tabulados e detalhados a seguir.

Os alimentos ditos cariogênicos (carboidratos, açúcares e derivados) foram reunidos agrupados conforme a frequência de seu consumo em pontos. Foi dado ao uso diário, o escore de 5 pontos, seguido por 2 pontos pelo consumo semanal e 1 ponto pelo consumo raro (longo tempo sem ingerir). Foi realizada a somatória dos pontos para que se classificasse o padrão desses alimentos em alto e moderado. Foi dada como alta a somatória quando maior ou igual a 30 e moderada, quando a soma de valores for menor que 30 (FRAIZ;WALTER, 2001; LLENA; FORNER, 2008).

3.5. Coleta dos espécimes clínicos

As coletas dos espécimes na saliva e do biofilme na região subgengival das crianças e das mães foram realizadas no período da manhã. Este procedimento foi realizado antes do exame clínico, uma vez que para realização deste último procedia-se a profilaxia dental da cavidade bucal, podendo esta interferir nos resultados microbiológicos.

Na coleta dos espécimes de saliva não estimulada, para as crianças edêntulas, foram utilizados zaragatoas estéreis, que eram gentilmente passadas pelo soalho bucal e na região dos roletes gengivais. Previamente, no laboratório, verificou-se que

esses swabs eram capazes de absorver 350 µL de saliva. A seguir, as zaragatoas eram transferidas para microtubos com 200 µL de água ultra-pura MilliQ e mantidas em gelo, até o transporte para o laboratório para extração do DNA microbiano.

Para as mães, as amostras de saliva não estimuladas eram imediatamente transferidas para os microtubos e mantidas em gelo, como descrito acima.

A partir do momento em que as crianças já possuíam dentes, o biofilme dental dos incisivos centrais e do dente com sangramento gengival aparente era coletado com auxílio de cones de papel absorvente esterilizados que eram introduzidos no interior dos sulcos gengivais, onde permaneciam por 15 segundos. Entretanto, pela impossibilidade de realizar a remoção do biofilme supragengival de forma satisfatória, optou-se por considerar os biofilmes supra e subgengivais como um único biofilme, denominado de biofilme dental. A seguir, os cones de papel eram transferidos para os microtubos e também mantidos em gelo até a extração do DNA.

Para a coleta de espécimes do biofilme subgengival nas mães, foram utilizados cones de papel absorvente estéreis, que eram posicionados no interior do sulco gengival do dente com maior profundidade clínica de sondagem e sangramento gengival, onde permaneciam por um minuto. A seguir, as amostras também eram transferidas para os microtubos com água ultra-pura MilliQ, para diluição dos espécimes destinados a extração de DNA.

3.6. Extração do DNA microbiano e determinação de sua concentração

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água MilliQ era extraído por meio do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Cada amostra era adicionada a 20µL de proteinase K, seguida de 200µL do tampão AL, mantendo-se a mistura a 56°C, por 10 minutos, adicionando-se, a seguir, etanol absoluto (200 µL) e centrifugando-se o conjunto através do “QIAamp Column”, a 6000xg, por 1 minuto. A seguir, desprezava-se o filtrado e adicionavam-se 500 µL do tampão AW1 e repetia-se a centrifugação, desprezando-se, novamente, o filtrado. Imediatamente, 500 µL do

tampão AW2 eram adicionados ao “QIAamp Column” e o conjunto era centrifugado a 14.000xg por 3 minutos. Desprezava-se o filtrado, enquanto 200 µL de tampão AE eram adicionados ao “QIAamp Column”, por 1 minuto, antes de submeter o conjunto à centrifugação final a 6000xg, por 1 minuto. O filtrado era mantido a - 196°C. A concentração do DNA alvo, em cada amostra, era determinada em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância (A260 nm).

3.7. Detecção por nested PCR e PCR convencional dos microrganismos alvo e víruses CMV, HSV-1 E EBV-1.

A presença de membros da família *Enterobacteriaceae*, de gênero *Enterococcus*, *E. faecalis* (FOSCHI et al., 2005; KE et al., 1999), *E. faecium* (CHENG et al., 1997), *Helicobacter* (LUNDSTRÖM et al., 2001), *H. pylori* (SONG et al., 1999), *Pseudomonas*, *P.aeruginosa* (SPILKER et al., 2004), espécies do complexo da *Burkholderia cepacia* (MCDOWELL et al., 2001), bem como os víruses Epstein-Barr tipo 1, Citomegalovírus (IMBRONITO et al., 2008a) e Herpes simples tipo 1 (IMBRONITO et al., 2008b) foi avaliada pela amplificação do DNA microbiano por PCR, empregando-se iniciadores e condições específicas para cada agente infeccioso em termociclador Amplitherm (GeneAmp PCR System). Os iniciadores e a temperatura de anelamento dos mesmos são apresentados nas **Tabelas 1 e 2**.

Ao contrário dos demais agentes infecciosos, *Helicobacter* sp., *H. pylori* e os víruses da família *Herpesviridae* foram detectados através de “nested” PCR, onde 5µL do produto da amplificação inicial do DNA, utilizando-se iniciadores externos, eram submetidos a um segundo conjunto de ciclos de amplificação empregando-se iniciadores internos.

As amplificações do DNA eram realizadas em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de MgCl₂ (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água

ultrapura MilliQ esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação era realizada em aparelho de PCR programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (30s. a 1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador por 30 s.- 2 min., 72°C (30s. a 1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min. a 7 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação.

Em todas as reações foi utilizado, como controle positivo, DNA de cepas de referência das bactérias estudadas (*Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, *Burkholderia multivorans* ATCC 17616, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 35667, *Escherichia coli* ATCC 35218 e ATCC 25922, *H. pylori* ATCC 43504, *P. aeruginosa* ATCC 10145, *Pseudomonas putida* ATCC 49128), enquanto DNA controle dos vírus EBV-1, HSV-1 e CMV foi fornecido pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador de luz ultravioleta com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP).

Tabela 1. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional para detecção de diferentes microrganismos por PCR convencional.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>Enterobacteriaceae</i>	5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3' 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'	50° C
<i>Enterococcus</i> spp.	5'- TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3' 5'- AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC -3'	55° C
<i>E. faecalis</i>	5'- ATC AAG TAC AGT TAG TCT-3' 5'- ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3'	47° C
<i>E. faecium</i>	5'-ATT GTG GCT AAA ATT ATA GTT-3' 5'-ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G-3'	55° C
<i>Pseudomonas</i> spp.	5'-GAC GGG TGA GTA ATG CCT A-3' 5'-CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA-3'	54° C
<i>P. aeruginosa</i>	5'-GGG GGA TCT TCG GAC CTC A-3' 5'-TCC TTA GAG TGC CCA CCC G-3'	58° C
complexo da <i>Burkholderia cepacia</i>	5'-TGA CCG CCG AGA AGA GCA A-3' 5'-CTC TTC TTC GTC CAT CGC CTC-3'	56° C
Universal	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3' 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	55° C

Tabela 2. Iniciadores e temperatura de anelamento empregados no “*nested*” PCR para detecção de *Helicobacter* spp. e *H. pylori*, além dos vírus da família *Herpesviridae*.

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>Helicobacter</i> spp.	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC A-3' iniciador externo	Inic. Externo 50°C
	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' iniciador externo	
	5'-TGG CAA TCA GCG TCA GGT AAT G-3' iniciador interno	Inic. Interno 50°C
	5'-GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C-3' iniciador interno	
<i>H. pylori</i>	5'-CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC-3' iniciador externo	Inic. Externo 55°C
	5'-AGG ATC AAG GTT TAA GGA TT-3' iniciador externo	
	5'-CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC-3' iniciador interno	Inic. Interno 62°C
	5'-ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC-3' iniciador interno	
Herpes virus tipo 1 (HSV-1)	5'-TAC ATC GGC GTC ATC TAC GGG G-3' inic. externo	Inic. Externo 57°C
	5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3' inic. externo	
	5'-GCG TTT ATC AAC CGC ACC TCC-3' inic. interno	Inic. Interno 56°C
	5'-CAG TTC GGC GGT GAG GAC AAA-3' inic. interno	
Citomegalovirus (CMV)	5'-GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A-3' ini. exteno	Inic. Externo 56°C
	5'-TCG ACG GTG GAG ATA CTG CTG AGG-3' inic. externo	
	5'-ACC ACC GCA CTG AGG AAT GTC AG-3' inic. interno	Inic. Interno 50°C
	5'-TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA-3' inic. interno	
Epstein-Barr tipo 1 (EBV-1)	5'-AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA-3' inic. externo	Inic. Externo 56°C
	5'-TGT GCT GGT GCT GCT GGT GG-3' inic. externo	
	5'-AAC TTC AAC CCA CAC CAT CA-3' inic. interno	Inic. Interno 46°C
	5'-TTC TGG ACT ATC TGG ATC AT-3' inic. interno	

3.8. Presença de diferentes marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos.

A presença de alguns dos principais genes responsáveis pela resistência às tetraciclinas, macrolídeos, lincosaminas, β -lactâmicos e metronidazol foi avaliada diretamente no DNA extraído das amostras clínicas.

Para a tetraciclina, a presença dos marcadores *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, e *tet(T)*, como descrito por Aminov et al. (2001) e Ng et al. (2001), foi avaliada. Os iniciadores específicos utilizados são apresentados na **Tabela 3**.

A presença dos genes *bla*_{TEM} (BELAAOUAJ et al., 1994), *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} (Henriques et al., 2006), que codificam para a produção das “*extended spectrum β -lactamases*”, e do gene *cfxA* (GIRAUD-MORIN et al., 2003), responsável pela resistência a essas drogas em anaeróbios bucais e intestinais, foi determinada através de PCR com iniciadores específicos (**Tabela 3**). A presença dos genes *erm(G)*, *erm(F)* e *erm(B)*, que codificam para a resistência a macrolídeos e lincosaminas foi avaliada segundo Löfmark et al. (2006), enquanto os genes *nim*, que codificam para a resistência aos nitroimidazóis em anaeróbios Gram-negativos, foram detectados através de PCR segundo metodologia descrita por Trinh e Reysset (1996).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA) programado para 94°C (5 min), seguido de 30-35 ciclos a 94°C (30s.-1 min); temperatura específica para cada par de iniciadores por 1 min.; 72°C por 1,0 min., seguidos de um ciclo adicional a 72°C por 5 min. a 7 min. para permitir a conclusão das reações de amplificação do DNA.

Os produtos da amplificação do DNA pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 μ g/ml) e fotografados sobre transiluminador de luz ultravioleta, como descrito anteriormente. Como controle positivo dos genes alvo foi utilizado o DNA de isolados clínicos

mantidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, FOA-UNESP, que se mostraram resistentes a essas drogas e portadores desses genes.

Tabela 3. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para detecção de genes de resistência a tetraciclina, macrolídeos, lincosaminas, nitroimidazóis e aos β -lactâmicos.

Alvo	Seqüência dos Oligonucleotídeos	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento
<i>tet(A)</i>	5'-GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC-3'	210	55°C
	5'-CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG-3'		
<i>tet(B)</i>	5'-AAACTTATTATATTATAGTG-3'	169	55°C
	5'-TGGAGTATCAATAATATTCAC-3'		
<i>tet(C)</i>	5'-CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG-3'	418	55°C
	5'-ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC-3'		
<i>tet(D)</i>	5'-AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC-3'	787	55°C
	5'-GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC-3'		
<i>tet(E)</i>	5'-AAA CCA CAT CCT CCA TAC GC-3'	278	55°C
	5'-AAA TAG GCC ACA ACC GTC AG-3'		
<i>tet(G)</i>	5'-CAG CTT TCG GAT TCT TAC GG-3'	884	55°C
	5'-GAT TGG TGA GGC TCG TTA GC-3'		
<i>tet(K)</i>	5'-TCG ATA GGA ACA GCA GTA-3'	169	55°C
	5'-CAG CAG ATC CTA CTC CTT-3'		
<i>tet L)</i>	5'-TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC-3'	267	55°C
	5'-GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG-3'		
<i>tet(M)</i>	5'-ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC-3'	171	55°C
	5'-TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC-3'		
<i>tet(O)</i>	5'-ACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC-3'	171	60°C
	5'-TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC-3'		
<i>tet(Q)</i>	5'-AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG-3'	169	60°C
	5'-CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA-3'		
<i>tet(S)</i>	5'-CAT AGA CAA GCC GTT GAC C-3'	667	50°C
	5'-ATG TTT TTG GAA CGC CAG AG-3'		
<i>tet(T)</i>	5'-AAG GTT TAT TAT ATA AAA GTG-3'	169	46°C
	5'-AGG TGT ATC TAT GAT ATT TAC-3'		
<i>bla_{TEM}</i>	5'-ATC GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC-3'	280	55°C
	5'-CCA CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG-3'		
<i>bla_{CTX-M}</i>	5'-CAG TCG ATA GGA ACA GCA GTA-3'	310	55°C
	5'-GAC CAG CAG ATC CTA CTC CTT-3'		
<i>bla_{SHV}</i>	5'-TAG TACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC-3'	251	60°C
	5'-CCT TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC-3'		
<i>cfxA</i>	5'-CGT AGT TTT GAG TAT AGC TTT-3'	802	58°C
	5'-GAT GTT GCC TAT ATA TGT C-3'		

Alvo	Seqüência dos Oligonucleotídeos	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento
<i>erm</i> (B)	5'- AAC CAA AAG TAA ACA GTG TCT TAA -3'	110	60°C
	5'- AAC AGT TGA CGA TAT TCT CGA TT -3'		
<i>erm</i> (F)	5'- GTC GTG TCG TGT GCA AAA TA -3'	120	60°C
	5'- TTC GTG CTT CTA TGA CAG TGA -3'		
<i>erm</i> (G)	5'-ACT GCT GAA TTG GTA AAG AGA TG -3'	210	60°C
	5'- TGT GCT TAT GTT GTA AGG TAT GC -3'		
<i>nim</i>	5'-ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG-3'	458	62°C
	5'-GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC-3'		

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros clínicos avaliados, como os modelos de amamentação, higienização e dieta entre os integrantes do estudo, foram avaliados de acordo com o teste exato de Fisher e teste de Qui-quadrado.

A distribuição dos diferentes tipos de microrganismos estudados entre as crianças e suas mães foi analisada através do teste de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos (ANOVA_{mr}), segundo Brunner e Langer (2000).

A tabulação dos dados referentes às condições socioeconômicas e culturais das mães e as condições de saúde bucal das crianças foi avaliada através do teste de Qui-quadrado, enquanto a inter-relação dicotômica entre a ocorrência de cada microrganismo e para cada variável não microbiológica foi determinada através dos testes de Mann-Whitney e exato de Fisher.

As correlações entre os diferentes microrganismos ao longo do período de análise foram determinadas através do teste de correlações de Spearman. Adotou-se o nível de significância para ensaios biológicos com $p < 0,05$.

Essa análise foi realizada no Centro de Matemática, Computação e Cognição da Universidade Federal do ABC-UFABC. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir foram divididos de acordo com a faixa etária dos bebês que compunham a amostra.

Foram selecionados 68 bebês, com idade inicial de 6 meses, baseado na metodologia estabelecida para a pesquisa. Vale ressaltar, por ser uma pesquisa de follow-up extenso, o número final de pacientes participantes na pesquisa sofreu um decréscimo.

Com relação às mães, foi verificado que, aproximadamente, 14,7% das mães possuíam apenas o 1º grau do ensino fundamental como escolaridade; aproximadamente 50,0% das mães na faixa do 2º grau e 35,3% no 3º grau, como apresentado no Gráfico 1. Assim verifica-se que parte significativa das mães que procuram atendimento odontológico preventivo educativo, possui grau de instrução mediano ou superior completo, mesmo se tratando de um serviço público e gratuito.

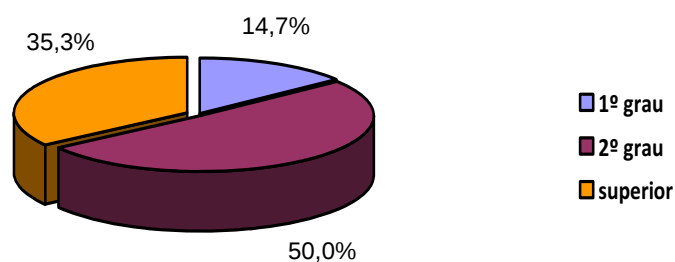


Gráfico 1 - Distribuição das mães de acordo com a sua escolaridade.

RESULTADOS – CRIANÇAS 6 MESES DE IDADE E MÃES

Na fase inicial da pesquisa, foram realizadas 68 coletas de saliva dos bebês e igual número de amostras de saliva e biofilme subgengival das mães.

Erupção Dental, Condições Gengivais e Higiene Bucal.

Aos 6 meses de idade, todos os bebês apresentaram-se edêntulos (N=68), com roletes gengivais e tecidos moles bucais em condições de normalidade. Apesar

desses pacientes estarem ingressando no programa educativo-preventivo da Bebê Clínica da FOA-UNESP, verificamos que 79,4% (54) das mães já realizavam, ou pelo menos assim relatavam, a higienização bucal de seus filhos com gaze ou fralda embebida em água oxigenada 10 volumes diluída. Entretanto, 20,6% (14) das mães responderam não ter o hábito de higienizar a boca dos bebês. (**Gráfico 2**). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$).

Quanto às mães, as condições de higiene bucal foram precárias, mesmo entre as que apresentavam maiores níveis de educação formal, sendo que apenas 9 (13,2%) apresentavam índice de placa igual ou inferior a 50%, deste modo, a média e desvio padrão foram $82,8 \% \pm 24,6 \%$. Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre as condições de higiene das mães e o seu nível de educação formal (teste de Qui-quadrado, $p = 0,836$), ou renda familiar (teste de Qui-quadrado, $p = 1,0$), da mesma forma que essa característica não mostrou correlação com a frequência declarada de escovação e uso de fio dental (teste de Qui-quadrado, $p = 0,35$) ou higienização dos bebês (teste de Qui-quadrado, $p = 1,0$). Todas as mães com índice de placa inferior a 50% eram periodontalmente sadias.

Quanto às condições periodontais das mães, 29 (42,6%) eram periodontalmente sadias, 32 (47,1%) possuíam gengivite associada ao biofilme microbiano, enquanto 7 (10,1%) eram portadoras de periodontite crônica.

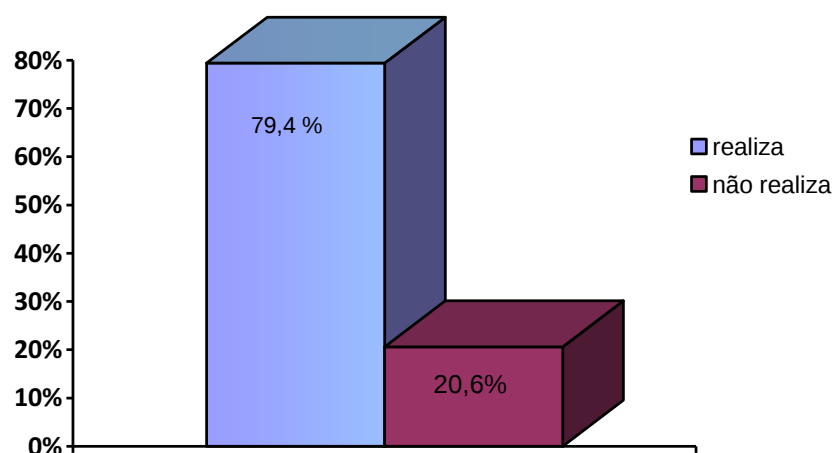


Gráfico 2 - Porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, de acordo com a realização ou não de procedimentos de higiene pelas mães.

Dieta e Hábitos Alimentares

De acordo com o **Gráfico 3**, foi verificado neste estudo que apenas 36,8% (25) dos bebês eram amamentados exclusivamente no peito; 38,2% (26) das crianças eram alimentadas com mamadeira e 25% (17) com a associação de mamadeira com aleitamento materno. Esses três padrões de dieta, aos seis meses de idade, foram semelhantes em termos de distribuição na população estudada, não mostrando correlação com outros aspectos estudados. (teste Qui-quadrado, $P= 0,78$).

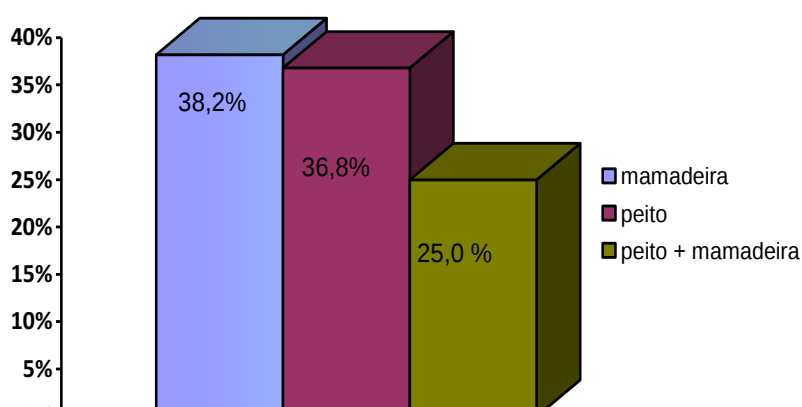


Gráfico 3 - Porcentagem de bebês avaliados aos 6 meses de idade, quanto ao tipo de amamentação ingerida.

Com relação aos hábitos alimentares noturnos, das 68 crianças avaliadas, 35,3% (24) apresentavam o hábito de acordar para mamar e dormir mamando, 47,0% (32) acordava para mamar e 13,2% (9) dormiam mamando e 4,4% (3) não possuíam o hábito de alimentação noturna (**Gráfico 4**). Os dados mostram que, aos seis meses, estas diferenças foram consideradas significantes estatisticamente (teste de Qui-quadrado, $p < 0,001$).

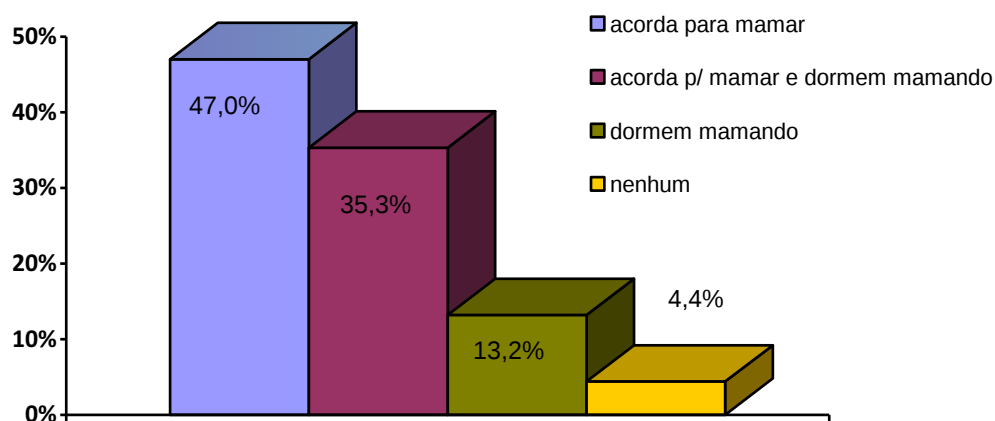


Gráfico 4 - Categorização dos bebês examinados aos 6 meses de idade, de acordo com os tipos de hábitos alimentares noturnos. Valores expressos em percentagem.

Prevalência de Cárie Dentária

Não houve registro desses dados nesse período da pesquisa por serem pacientes ainda edêntulos.

Avaliação Microbiológica

Através de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, observou-se que a ocorrência da família *Enterobacteriaceae* ($p = 0,048$), os gêneros *Enterococcus* ($p = 0,043$) e *Helicobacter* ($P = 0,027$), *E. faecalis* ($p = 0,045$), *H. pylori* ($p = 0,029$) e os vírus CMV ($p < 0,001$) e EBV-1 ($p < 0,001$) apresentaram maior frequência de detecção na saliva das mães (**Tabela 4**). Por outro lado, o número de amostras de

saliva materna contaminadas com *E. faecium*, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia* ou vírus HSV-1 foi modesto, de forma que mesmo que as mães tenham apresentado maior prevalência desses microrganismos, essa diferença não mostrou relevância estatística.

Embora a colonização da cavidade bucal das mães por *Enterobacteriaceae* e pseudomonados não tenha sido influenciada de forma estatisticamente significativa pelas condições de higiene das pacientes, esse fenômeno está mais associado às dimensões do grupo amostral e a baixa prevalência desses patógenos, embora nenhuma das pacientes com índice de placa inferior a 50% apresentou contaminação por esses microrganismos.

Os dados apresentados na **Tabela 4** evidenciam boa correlação entre a presença dos microrganismos alvo no biofilme subgengival e saliva das mães, sugerindo que essa última possa ser utilizada para avaliação da prevalência dos mesmos na cavidade bucal, embora para *Enterococcus* spp. e *E. faecalis*, as discrepâncias entre os dados do biofilme e da saliva tenham se mostrado maiores.

Através do teste de correlações de Spearman, verificou-se que a distribuição dos microrganismos estudados apresentou relação positiva entre mães e crianças, sugerindo que as mães podem ser as principais fontes de infecção desses microrganismos, sendo a saliva um veículo de transmissão.

Tabela 4. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados, na saliva de bebês aos 6 meses de idade, além da saliva e biofilme de suas mães.

Microrganismo	Grupos Experimentais – 6 meses N (%)			
	SALIVA		BIOFILME	
	Bebês (N= 68)	Mães (N=68)	Bebês (N=68)*	Mães (N=68)
Bactérias				
<i>Enterobacteriaceae</i>	4 (5,9)	12 (17,6)	-	19 (27,9)
<i>Enterococcus</i> spp.	5 (7,4)	15 (22,1)	-	23 (33,8)
<i>E. faecalis</i>	5 (7,4)	13 (19,1)	-	21 (30,9)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	2 (2,9)	-	5 (7,4)
<i>Helicobacter</i> spp.	5 (7,4)	27 (39,7)	-	31 (45,6)
<i>H. pylori</i>	4 (5,9)	26 (38,2)	-	28 (41,2)
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (2,9)	7 (10,3)	-	9 (13,2)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (2,9)	4 (5,9)	-	8 (11,8)
complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	0 (0,0)	4 (5,9)	-	6 (8,8)
Viruses				
CMV	0 (0,0)	22 (32,4)	-	28 (41,2)
EBV-1	0 (0,0)	23 (33,8)	-	29 (42,6)
HSV-1	0 (0,0)	5 (7,4)	-	7 (10,3)

*Bebês edentulos aos seis meses de idade.

Tabela 5. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva das mães e dos bebês aos 6 meses, em relação às condições periodontais das progenitoras.

Microrganismo	Mães sadias (N= 29)		Mães com gengivite (N= 32)		Mães com periodontite (N=7)	
	Saliva Bebês	Saliva Mães	Saliva Bebês	Saliva Mães	Saliva Bebês	Saliva Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,4)	3 (10,3)	3 (9,4)	7 (21,9)	0 (0,0)	2 (28,6)
<i>Enterococcus</i> spp.	0 (0,0)	4 (13,8)	3 (9,4)	9 (28,1)	2 (28,6)	2 (28,6)
<i>E. faecalis</i>	0 (0,0)	3 (10,3)	3 (9,4)	8 (22,9)	2 (28,6)	2 (28,6)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Helicobacter</i> spp.	1 (3,4)	9 (31,0)	4 (12,5)	15 (46,9)	0 (0,0)	3 (42,9)
<i>H. pylori</i>	1 (3,4)	8 (27,6)	3 (9,4)	15 (46,9)	0 (0,0)	3 (42,9)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0 (0,0)	2 (6,9)	1 (3,1)	4 (12,5)	1 (14,3)	1 (14,3)
<i>P. aeruginosa</i>	0 (0,0)	1 (3,4)	1 (3,1)	3 (9,4)	1 (14,3)	0 (0,0)
complexo <i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>	0 (0,0)	1 (3,4)	0 (0,0)	3 (9,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Viruses						
CMV	0 (0,0)	4 (13,8)	0 (0,0)	13 (40,6)	0 (0,0)	5 (71,4)
EBV-1	0 (0,0)	4 (13,8)	0 (0,0)	14 (43,8)	0 (0,0)	5 (71,4)
HSV-1	0 (0,0)	2 (6,9)	0 (0,0)	3 (9,4)	0 (0,0)	0 (0,0)

Através de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, verificou-se que todos os agentes infecciosos estudados apresentam aumento de prevalência nas mães com gengivite e periodontite (**Tabela 5**), tanto na saliva quanto no biofilme, mas para *E. faecium* ($p= 0,79$), *Helicobacter* spp. ($p= 0,65$), *H. pylori* ($p= 0,61$), *Pseudomonas* spp. ($p= 1,0$), *P. aeruginosa* ($p= 1,0$), complexo *Burkholderia cepacia* ($p= 0,92$) e o vírus HSV-1 ($p= 0,83$), esse aumento de prevalência não foi estatisticamente significativo.

Nesse sentido, família *Enterobacteriaceae* ($p= 0,041$), *Enterococcus* spp. ($p= 0,032$), *E. faecalis* ($p= 0,036$), e os vírus CMV ($p<0,01$) e EBV-1 ($p<0,01$) mostraram correlação estatisticamente significativa com o sangramento gengival e com gengivite, sendo raros em mães periodontalmente saudáveis. Em função do pequeno número de mães com higiene bucal satisfatória, não foi possível comparar a microbiota oportunista observada nas mães com higiene satisfatória e as demais. Para esses microrganismos, observaram-se correlações estatisticamente significativas entre a condição periodontal das mães, a presença desses microrganismos na saliva e biofilme maternos e saliva das crianças (valores de p entre $p= 0,038$ e $p<0,01$).

Tabela 6. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados no na saliva e biofilme das mães aos 6 meses, em relação às condições periodontais das mesmas.

Microrganismo	Mães sadias (N= 29)		Mães com gengivite (N= 32)		Mães com periodontite (N=7)	
	Saliva Mães	Biofilme Mães	Saliva Mães	Biofilme Mães	Saliva Mães	Biofilme Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	3 (10,3)	5 (17,3)	7 (21,9)	11 (34,4)	2 (28,6)	3 (42,8)
<i>Enterococcus</i> spp.	4 (13,8)	6 (20,7)	9 (28,1)	13 (40,6)	2 (28,6)	4 (57,1)
<i>E. faecalis</i>	3 (10,3)	6 (20,7)	8 (22,9)	12 (37,5)	2 (28,6)	3 (42,8)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)	4 (12,5)	0 (0,0)	1 (14,3)
<i>Helicobacter</i> spp.	9 (31,0)	11 (37,9)	15 (46,9)	17 (53,1)	3 (42,9)	3 (42,8)
<i>H. pylori</i>	8 (27,6)	10 (34,5)	15 (46,9)	15 (46,9)	3 (42,9)	3 (42,8)
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (6,9)	3 (10,3)	4 (12,5)	5 (15,6)	1 (14,3)	1 (14,3)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (3,4)	2 (6,9)	3 (9,4)	5 (15,6)	0 (0,0)	1 (14,3)
complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	1 (3,4)	2 (6,9)	3 (9,4)	3 (9,4)	0 (0,0)	1 (14,3)
Viruses						
CMV	4 (13,8)	5 (17,3)	13 (40,6)	16 (50,0)	5 (71,4)	7 (100,0)
EBV-1	4 (13,8)	6 (20,7)	14 (43,8)	16 (50,0)	5 (71,4)	7 (100,0)
HSV-1	2 (6,9)	2 (6,9)	3 (9,4)	5 (15,6)	0 (0,0)	0 (0,0)

RESULTADOS – CRIANÇAS 12 MESES DE IDADE E MÃES

Neste segundo momento de coleta de dados e materiais para análise, houve redução do número de participantes de 68 para 63 bebês e suas mães, por motivos diversos, como perda de contato ou utilização de antimicrobianos.

Das mães que continuaram participando do estudo (N=63), 27 (42,9%) eram periodontalmente saudáveis, 31 (49,2%) eram portadoras de gengivite, 5 (7,9%) apresentavam periodontite, não mostrando diferenças significativas em relação ao grupo que iniciou o estudo. Da mesma forma as condições de higiene bucal não mostraram melhora significativa, quando comparadas com os dados obtidos no início da pesquisa.

Erupção Dentária e Condição Gengival dos Bebês

A partir desta fase de avaliação, os 63 pacientes que permaneceram na pesquisa apresentavam ao menos algum dente erupcionado. Aos 12 meses de idade, 11 (17,5%) crianças tinham até dois dentes erupcionados, 21 (33,3%) apresentavam de 3 a 5 dentes já erupcionados, 24 (38,1%) tinham entre 6 e 8 dentes nessas condições, enquanto 7 (11,1%) apresentavam de 9 a 10 elementos dentais erupcionados (**Gráfico 5**).

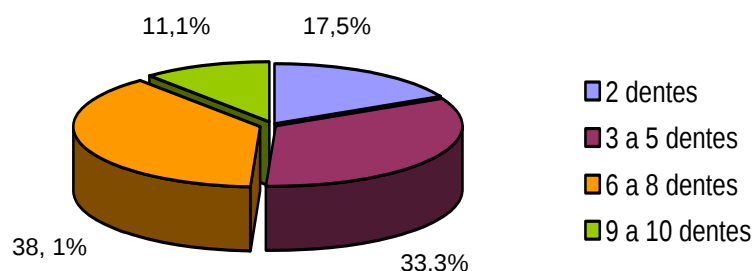


Gráfico 5. Número de dentes erupcionados nas crianças com 12 meses.

No que concerne aos tecidos gengivais dos pacientes nesta fase da pesquisa, verifica-se que os mesmos apresentavam padrão de normalidade, não havendo

modificação em inserção, textura e coloração. Os dentes erupcionados examinados apresentavam padrão de normalidade em relação à implantação. A título de avaliação da inserção tecidual, a interpretação da profundidade clínica de sondagem era avaliada cuidadosamente em associação com as demais condições clínicas, uma vez que falsas bolsas e sulcos gengivais mais profundos podem ser observados em dentes irrompendo na cavidade bucal.

Higiene Bucal dos Bebês

No quesito higiene bucal dos bebês, as mães relataram realizar a mesma com gaze e água oxigenada 10 volumes diluída ou apenas com água em 41,3% (26) crianças uma vez ao dia, em 36,5% (23) duas vezes ao dia, em 19% (12) três ou mais vezes ao dia, e em 3,2% (2) a higiene era realizada raramente (**Gráfico 6**).

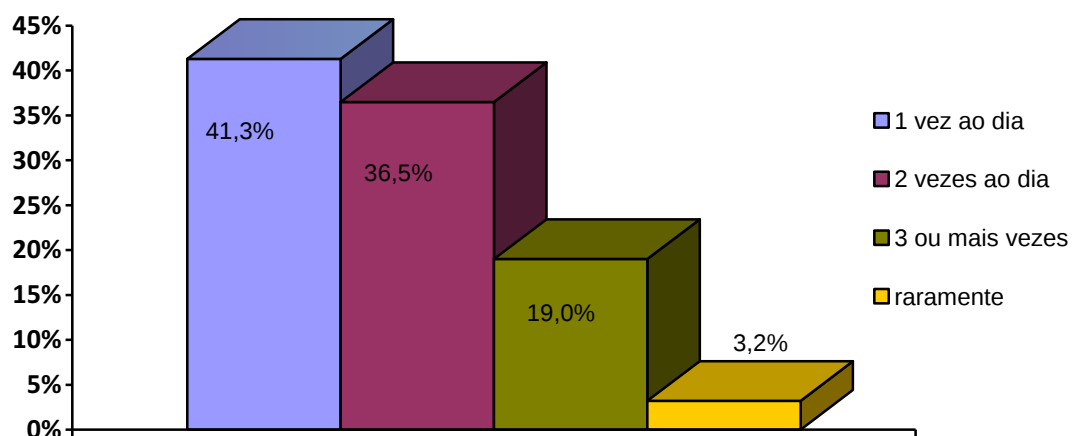


Gráfico 6 - Porcentagem de bebês avaliados aos 12 meses de idade, com relação à frequência de higienização bucal.

Dieta Alimentar

Avaliando-se os diários alimentares preenchidos pelas mães, todas as crianças apresentavam um padrão de consumo moderado em relação à ingestão de alimentos cariogênicos. Vale ressaltar que, no presente estudo, foi considerada como consumo moderado a ingestão dos referidos alimentos em seis ou menos refeições durante a semana, baseado no escore admitido para a análise do diário alimentar.

Prevalência de Cárie Dentária nos Bebês

No período de avaliação, após exame clínico detalhado, não houve a detecção clínica de cárie nos dentes decíduos das crianças, apresentando-se hígidos.

Avaliação Microbiológica

Aos 12 meses de idade, os agentes infecciosos, objetos do presente estudo, evidenciaram um padrão de colonização semelhante ao observado aos 6 meses; o mesmo também foi observado para as mães. Nenhum microrganismo estudado mostrou uma elevação significativa, em termos de prevalência, na saliva de bebês e crianças entre 6 e 12 meses (**Tabela 7**).

Através de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, observou-se que a ocorrência da família *Enterobacteriaceae* ($p = 0,048$), os gêneros *Enterococcus* ($p = 0,043$) e *Helicobacter* ($p = 0,027$), *E. faecalis* ($p = 0,047$), *H. pylori* ($p = 0,027$) e os vírus CMV ($p < 0,001$) e EBV-1 ($p < 0,001$) apresentaram maior frequência de detecção na saliva das mães (**Tabela 7**). Como também observado aos 6 meses, o total de amostras de saliva materna e dos bebês contaminadas com *E. faecium*, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia* ou vírus HSV-1 foi modesto, impossibilitando, no universo de dados obtidos, diferenciar a contaminação salivar das mães e crianças quanto a esses últimos patógenos.

O número de dentes erupcionados não afetou significativamente a distribuição dos agentes infecciosos estudados (ANOVA, com p variando de $p = 0,675$ a $p = 1,0$).

Os dados apresentados na **Tabela 7** também evidenciam boa correlação entre a presença dos microrganismos alvo no biofilme subgengival e saliva das mães e, da mesma forma, das crianças, sugerindo que a presença desses agentes na cavidade bucal das crianças apresenta alguma estabilidade, o que implicaria a existência de um processo de colonização, no caso das bactérias estudadas, ou infecção, para os

víruses CMV e EBV-1. Esses dados maternos se assemelham aos obtidos no início do estudo.

Quanto ao biofilme subgengival das mães, quando comparado com o biofilme das crianças, observam-se as mesmas características já descritas para a saliva: maior prevalência de membros da família *Enterobacteriaceae*, gênero *Enterococcus* e *E. faecalis*, bem como do gênero *Helicobacter* e *H. pylori*, além de CMV e EBV-1 nas amostras maternas (ANOVA, com variando de $p=0,043$ a $p<0,01$). Os demais microrganismos estudados foram detectados em baixa prevalência nas mães e bebês, de forma a não permitir comparações estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Quando os dados das mães aos 12 meses são comparados com os dados obtidos aos 6 meses, observa-se grande estabilidade da prevalência desses microrganismos oportunistas e superinfectantes. Para os microrganismos mais prevalentes, como a família *Enterobacteriaceae*, gêneros *Enterococcus* e *Helicobacter*, além de *E. faecalis*, *H. pylori*, víruses CMV e EBV-1, a reprodutibilidade dos resultados entre as coletas aos 6 e 12 meses foi sempre superior a 78,6% (para CMV) atingindo 96,4% no caso de *H. pylori*, sugerindo a presença mais estável no ambiente bucal. Para os demais microrganismos, resultados semelhantes foram obtidos entre 60% a 77,8% das amostras, dependendo do microrganismo alvo.

Nas amostras de saliva, para as mães, a estabilidade da detecção desses microrganismos foi compatível à descrita acima para o biofilme, variando de 92,3% para *E. faecalis* a 77,4% para o gênero *Helicobacter*, entre os microrganismos detectados com maior frequência, e entre 50% e 75% para os demais microrganismos, como os integrantes do complexo da *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente.

Da mesma forma, foi observado na saliva e no biofilme das mães, um conjunto de patógenos oportunistas constituído pelos microrganismos entéricos, pelo gênero *Helicobacter* e *H. pylori*, o que demonstra uma colonização mais estável, com

concordância entre a primeira e a segunda coleta ao redor de 70%, sendo que quando a criança era portadora de *Helicobacter* spp., *H. pylori*, família *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. ou *E. faecalis*, a mãe também apresentava esses microrganismos na saliva ou biofilme em 83,3%, 100,0%, 71,4%, 71,4% e 57,1% dos casos. Para os vírus CMV e EBV, embora as crianças em que os mesmos foram detectados sejam filhas de mães portadoras, não houve concordância de resultados entre as duas coletas realizadas, visto que esses vírus não foram detectados aos 6 meses de idade na saliva das crianças.

Não foram observadas quaisquer influências do tipo de dieta, hábitos alimentares noturnos, características de higienização das crianças e a microbiota observada nas **Tabelas 7, 8 e 9**, sendo que através do teste exato de Fisher os valores de significância variaram de $p= 0,82$ a $p = 1,0$. Por outro lado, as **Tabelas 8 e 9** demonstram que existe influência das condições periodontais na ocorrência de alguns desses microrganismos na saliva e biofilme das mães e, posteriormente, na saliva e biofilme das crianças com 12 meses de idade.

Tabela 7. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva e no biofilme de bebês aos 12 meses de idade e suas mães.

Microrganismo	Grupos Experimentais – 12 meses N (%)			
	SALIVA		BIOFILME	
	Bebês (N= 63)	Mães (N=63)	Bebês (N= 63)	Mães (N=63)
Bactérias				
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (11,1)	11 (17,5)	8 (12,7)	16 (25,4)
<i>Enterococcus</i> spp.	7 (11,1)	13 (20,6)	13 (20,6)	20 (31,7)
<i>E. faecalis</i>	7 (11,1)	12 (19,1)	10 (15,9)	17 (27,0)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	1 (1,6)	0 (0,0)	3 (4,8)
<i>Helicobacter</i> spp.	6 (9,5)	21 (33,3)	10 (15,9)	25 (39,7)
<i>H. pylori</i>	6 (9,5)	21 (33,3)	7 (11,1)	27 (42,9)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1 (1,6)	5 (7,9)	2 (3,2)	7 (11,1)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (1,5)	4 (6,3)	2 (3,2)	6 (9,5)
complexo				
<i>Bukholderia cepacia</i>	0 (0,0)	3 (4,8)	0 (0,0)	4 (6,3)
Viruses				
CMV	3 (4,8)	19 (30,2)	8 (12,7)	22 (34,9)
EBV-1	2 (3,2)	18 (28,6)	10 (15,9)	26 (41,3)
HSV-1	0 (0,0)	7 (11,1)	0 (0,0)	5 (7,9)

Tabela 8. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva de bebês aos 12 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas.

Microrganismo	Mães Sadias (N= 27)		Mães com Gengivite (N= 31)		Mães com Periodontite (N=5)	
	Bebês	Mães	Bebês	Mães	Bebês	Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)	3 (11,1)	4 (12,9)	5 (16,1)	2 (40,0)	3 (60,0)
<i>Enterococcus</i> spp.	2 (7,4)	4 (14,8)	5 (16,1)	8 (25,8)	0 (0,0)	1 (20,0)
<i>E. faecalis</i>	2 (7,4)	3 (11,1)	4 (12,9)	8 (25,8)	1 (20,0)	1 (20,0)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0,0)	0 (0,0)
<i>Helicobacter</i> spp.	3 (11,1)	8 (29,6)	3 (11,1)	12 (38,7)	0 (0,0)	1 (20,0)
<i>H. pylori</i>	2 (7,4)	8 (29,6)	3 (11,1)	12 (38,7)	1 (20,0)	1 (20,0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	4 (12,9)	0 (0,0)	1 (20,0)
<i>P. aeruginosa</i>	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (3,2)	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	2 (6,5)	0 (0,0)	0 (0,0)
Viruses						
CMV	0 (0,0)	2 (7,4)	3 (11,1)	13 (41,9)	0 (0,0)	4 (80,0)
EBV-1	0 (0,0)	2 (7,4)	2 (6,5)	12 (38,7)	0 (0,0)	4 (80,0)
HSV- 1	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	1 (20,0)

Tabela 9. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados no biofilme dental de bebês aos 12 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas.

Microrganismo	Mães Sadias (N= 27)		Mães com Gengivite (N= 31)		Mães com Periodontite (N=5)	
	Bebês	Mães	Bebês	Mães	Bebês	Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,7)	4 (14,8)	5 (16,1)	8 (25,8)	2 (40,0)	4 (80,0)
<i>Enterococcus</i> spp.	3 (11,1)	7 (25,9)	8 (25,8)	10 (32,3)	2 (40,0)	3 (60)
<i>E. faecalis</i>	2 (7,4)	3 (11,1)	6 (19,4)	11 (35,5)	2 (40,0)	3 (60,0)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	0 (0,0,0)	1 (20,0)
<i>Helicobacter</i> spp.	4 (14,8)	8 (29,6)	5 (16,1)	15 (48,4)	1 (20,0)	2 (40,0)
<i>H. pylori</i>	2 (7,4)	8 (29,6)	4 (12,9)	17 (54,8)	1 (20,0)	2 (40,0)
<i>Pseudomonas</i> spp.	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	6 (19,4)	0 (0,0)	1 (20,0)
<i>P. aeruginosa</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,5)	6 (19,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
Viruses						
Citomegalovírus	1 (3,7)	2 (7,4)	5 (16,1)	16 (51,6)	2 (40,0)	4 (80,0)
EBV-1	1 (3,7)	4 (14,8)	7 (22,5)	17 (54,8)	2 (40,0)	5 (100,0)
HSV- 1	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	0 (0,0)

RESULTADOS – CRIANÇAS 18 MESES DE IDADE E MÃES

Por se tratar de um estudo de projeção longitudinal, neste terceiro momento de coleta de dados e materiais para análise houve diminuição do número de crianças e suas mães de 63 pares para 56 pares bebês/mães, por motivos diversos, como perda de contato ou utilização de antimicrobianos. Assim, quando comprometido um elemento do par (mãe/bebê), a dupla foi excluída, para que houvesse uniformidade dos dados.

Das mães que permaneceram no estudo, 26 (46,4%) eram periodontalmente saudáveis, 27 (48,2%) eram portadoras de gengivite e 3 (5,4%) tinham periodontite crônica.

Erupção Dentária e Condição Gengival

Aos 18 meses de idade, 19 (33,9%) bebês tinham até 10 dentes erupcionados e 37 (66,1%) apresentavam entre 10 e 20 elementos dentais erupcionados.

Com relação aos tecidos gengivais das crianças, como também observado aos 12 meses, verificou-se que os mesmos seguem em padrão de normalidade, não havendo modificação em inserção, textura e coloração. Os dentes erupcionados examinados apresentavam padrão de normalidade em relação à implantação. O número de crianças com pelo menos 11 dentes erupcionados aos 18 meses de idade foi estatisticamente superior ao número de crianças com menos de 11 dentes (teste de Mann-Whitney, $p= 0,027$).

Higiene Bucal

No quesito higiene bucal dos bebês, as mães relataram se preocupar em realizar a higiene oral da criança, a qual era realizada com gaze e água oxigenada 10 volumes diluída ou apenas com água. Em 24 (42,9%) crianças, a higiene ocorria duas vezes ao dia, em 16 (28,6%) esta ocorria três ou mais vezes ao dia, e em 15 (26,8%) crianças, uma vez ao dia, sendo que, em apenas uma criança, a higiene era realizada

raramente (**Gráfico 7**). Vale ressaltar, que a partir deste momento, as mães eram orientadas a realizar a higienização bucal com escovas dentais, já que os molares já estavam em erupção. O grupo de crianças que recebia higienização com frequência de duas vezes ao dia foi estatisticamente maior do que os demais (teste de Qui-quadrado, $p= 0,049$, quando comparado com os valores do grupo de crianças que recebia higiene 3 ou mais vezes ao dia; $p= 0,046$, quando comparado com os valores do grupo de crianças que recebia higiene uma vez ao dia).

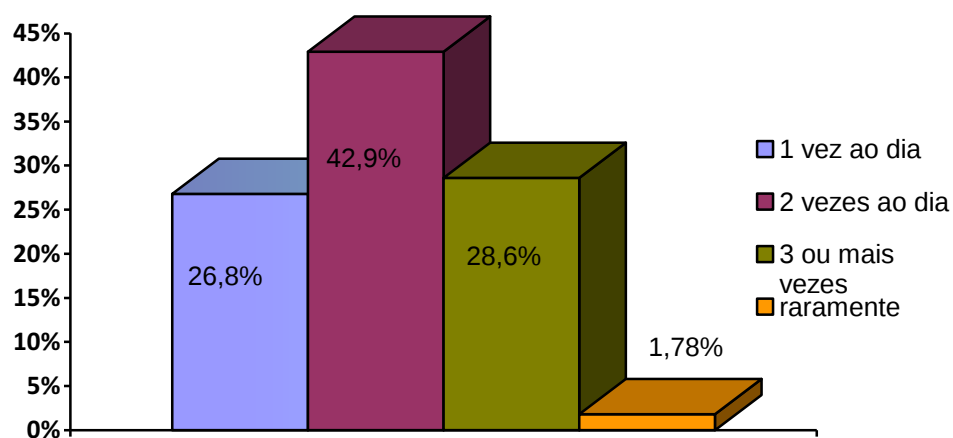


Gráfico 7 - Porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, com relação à frequência de higienização bucal.

Dieta Alimentar

Avaliando-se os diários alimentares preenchidos pelas mães, nesta fase houve uma modesta alteração com relação à administração de alimentos cariogênicos, sendo que algumas dessas mães passaram a oferecer aos seus filhos uma quantidade maior desses alimentos. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Qui-quadrado, $p= 0,32$).

Prevalência de Cárie Dentária

No período de avaliação aqui descrito houve alteração com a presença de cárie. Após a realização da profilaxia e posterior exame clínico dos bebês envolvidos,

verificou-se que 7,1% dos pacientes apresentavam lesão de cárie ativa na forma de mancha branca. Estas lesões cariosas foram observadas no incisivo central superior, na região cervical da face vestibular. Em função do número de crianças estudadas, a presença de cáries não diferiu significativamente da observada nas crianças com 12 meses de idade (teste exato de Fisher, $p= 0,43$) (**Gráfico 8**).

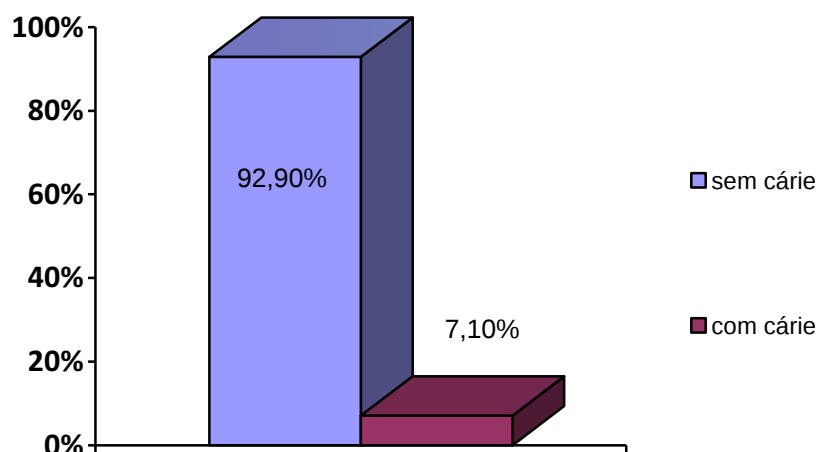


Gráfico 8 - Porcentagem de bebês avaliados aos 18 meses de idade, quanto a prevalência de lesão de cárie dentária.

Avaliação Microbiológica

As **Tabelas 10, 11 e 12** apresentam os dados microbiológicos da saliva e biofilme, das mães e crianças, relativos à terceira coleta, bem como a distribuição dos diferentes agentes infecciosos na saliva e biofilme de crianças e mães, separadas em grupos de acordo com as condições periodontais dessas últimas.

Aos 18 meses, também não foram observadas quaisquer influências do tipo de dieta, características de higienização das crianças e ocorrência dos patógenos estudados, sendo que, através do teste exato de Fisher, os valores de significância variaram de $p= 0,582$ a $p= 1,0$.

A comparação dos dados microbiológicos obtidos da saliva das crianças, nos três períodos de tempo, revela que houve um aumento modesto na ocorrência desses microrganismos e vírus oportunistas ou superinfectantes, mas apenas a prevalência de CMV e EBV-1 atingiram significância estatística (ANOVA, $p= 0,039$ e $p= 0,045$, respectivamente).

Embora não tenha atingido significância estatística, o aumento na frequência e a estabilidade da colonização por microrganismos entéricos, tanto Gram-negativos, como os membros da família *Enterobacteriaceae*, quanto Gram-positivos, como os enterococos, foram verificados. Quase sempre a mesma criança que mostrava a presença desses patógenos na saliva aos 6 meses de idade, também os albergava aos 12 e, principalmente, 18 meses de idade.

Essa uniformidade de resultados na saliva e biofilme das mães foi observada para todos os microrganismos e vírus estudados, com exceção para os pseudomonados, como o gênero *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* e integrantes do complexo da *Burkholderia cepacia*, que apresentaram maior irregularidade de detecção, o que sugere um estado mais transitório desses microrganismos.

Aos 18 meses de idade, a prevalência de microrganismos entéricos *Helicobacter* spp., *H. pylori* e vírus CMV e EBV-1 na saliva das mães ainda é superior ao observado nas crianças (ANOVA, com $p= 0,048$ a $p= 0,03$), enquanto para os demais agentes não se observaram diferenças significativas, em grande parte como consequência da baixa frequência e tamanho dos grupos amostrais.

Os dados do biofilme das crianças aos 18 e 12 meses se mostraram bastante semelhantes, sendo que nenhuma diferença de prevalência dos agentes infecciosos alvo atingiu significância estatística. Nesse sentido, as mesmas diferenças de prevalência observadas entre mães e crianças aos 12 meses foram confirmadas nessa terceira coleta.

A título de análise estatística aos 18 meses, uma vez que as mães com periodontite apresentavam a maioria das características clínicas das mães com

gingivite, e o número daquelas era modesto demais para constituir um grupo separado, optou-se por somar os dados de ambos os segmentos. Assim, as crianças cujas mães eram portadoras de gengivite ou periodontite, apresentavam três vezes o risco de adquirirem, de suas progenitoras, microrganismos entéricos e víruses CMV e EBV, bem como um risco duas vezes maior de atingir a idade de 18 meses como portadores do gênero *Helicobacter* ou *H. pylori*.

Tabela 10 - Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva e no biofilme de bebês aos 18 meses de idade e suas mães.

Microrganismo	Grupos Experimentais – 18 meses N (%)			
	SALIVA		BIOFILME	
	Bebês (N= 56)	Mães (N= 56)	Bebês (N= 56)	Mães (N= 56)
Bactérias				
<i>Enterobacteriaceae</i>	7 (12,5)	13 (23,2)	10 (17,9)	18 (32,1)
<i>Enterococcus</i> spp.	6 (10,7)	11 (19,6)	14 (25,0)	19 (33,9)
<i>E. faecalis</i>	6 (10,7)	11 (19,6)	11 (19,6)	17 (30,4)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	1 (1,8)	0 (0,0)	3 (5,4)
<i>Helicobacter</i> spp.	7 (12,5)	21 (37,5)	10 (17,9)	25 (44,6)
<i>H. pylori</i>	7 (12,5)	20 (35,7)	9 (16,1)	21 (37,5)
<i>Pseudomonas</i> spp.	2 (3,6)	6 (10,7)	3 (5,4)	8 (14,3)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (3,6)	5 (8,9)	3 (5,4)	8 (14,3)
complexo <i>Bukholderia cepacia</i>	0 (0,0)	3 (5,4)	0 (0,0)	5 (8,9)
Viruses				
CMV	9 (16,1)	18 (32,1)	9 (16,1)	21 (37,5)
EBV-1	7 (12,5)	17 (33,9)	8 (14,3)	19 (33,9)
HSV-1	2 (3,6)	4 (7,1)	0 (0,0)	6 (10,7)

Tabela 11. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados na saliva de bebês aos 18 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas.

Microrganismo	Mães Sadias (N=26)		Mães com Gingivite (N=27)		Mães com Periodontite (N= 3)	
	Bebês	Mães	Bebês	Mães	Bebês	Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	0 (0,0)	2 (7,7)	6 (22,2)	10 (37,0)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Enterococcus</i> spp.	1 (3,8)	3 (11,5)	5 (18,5)	6 (22,2)	0 (0,0)	1 (33,3)
<i>E. faecalis</i>	1 (3,8)	3 (11,5)	5 (18,5)	7 (25,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Helicobacter</i> spp.	2 (7,7)	9 (34,6)	4 (14,8)	11 (40,7)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>H. pylori</i>	1 (3,8)	8 (30,8)	5 (18,5)	11 (40,7)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1 (3,8)	1 (3,8)	1 (3,7)	4 (14,8)	0 (0,0)	1 (33,3)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (3,8)	1 (3,8)	1 (3,7)	4 (14,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Bukholderia cepacia</i> complex	0 (0,0)	1 (3,8)	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
Viruses						
CMV	0 (0,0)	1 (3,8)	6 (22,2)	14 (51,9)	3 (100,0)	3 (100,0)
EBV-1	0 (0,0)	2 (7,7)	5 (18,5)	12 (44,4)	2 (66,6)	3 (100,0)
HSV-1	1 (3,8)	3 (11,5)	1 (3,8)	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tabela 12. Ocorrência dos diferentes grupos bacterianos e vírus estudados no biofilme de bebês aos 18 meses de idade e suas mães, em relação às condições periodontais dessas últimas.

Microrganismo	Mães Sadias (N=26)		Mães com Gengivite (N=27)		Mães com Periodontite (N= 3)	
	Bebês	Mães	Bebês	Mães	Bebês	Mães
Bactérias						
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (3,8)	4 (15,4)	8 (29,6)	11 (40,7)	1 (33,3)	3 (100,0)
<i>Enterococcus</i> spp.	3 (11,5)	5 (19,2)	9 (33,3)	10 (37,0)	2 (66,6)	3 (100,0)
<i>E. faecalis</i>	2 (7,7)	5 (19,2)	7 (25,9)	10 (37,0)	2 (66,6)	2 (66,6)
<i>E. faecium</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (7,4)	0 (0,0)	1 (33,3)
<i>Helicobacter</i> spp.	2 (7,7)	9 (34,6)	7 (25,9)	14 (51,9)	1 (33,3)	2 (66,6)
<i>H. pylori</i>	2 (7,7)	8 (30,8)	6 (22,2)	11 (40,7)	1 (33,3)	2 (66,6)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1 (3,8)	2 (7,7)	1 (3,7)	5 (18,5)	1 (33,3)	1 (33,3)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (3,8)	2 (7,7)	2 (7,4)	4 (14,8)	0 (0,0)	2 (66,6)
complexo <i>Bukholderia cepacia</i>	0 (0,0)	2 (7,7)	0 (0,0)	3 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)
Viruses						
CMV	1 (3,8)	2 (7,7)	7 (25,9)	16 (59,3)	1 (33,3)	3 (100,0)
EBV-1	0 (0,0)	2 (7,7)	7 (25,9)	14 (51,9)	1 (33,3)	3 (100,0)
HSV-1	0 (0,0)	3 (11,5)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)

Associações Inter-Microbianas Detectadas nas Mães e nos Bebês

A análise da frequência de detecção dos diferentes microrganismos estudados, através do teste de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos, como proposto por Brunner & Langer (2000), e do teste de correlações de Spearman permitiu que algumas associações estatísticas entre os microrganismos fossem verificadas. Contudo, não se pode dizer com segurança que uma associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de duas espécies microbianas constitui prova de um relacionamento ecológico sinérgico ou antagônico, uma vez que tais dados não foram avaliados em estudos laboratoriais sob condições controladas, mas podem ser a base para futuras investigações nesse sentido.

Deve-se ressaltar que o presente estudo constitui a metade de um estudo mais amplo que incluiu muitos microrganismos membros da microbiota normal de mães e bebês, como *Actinomyces* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *F. periodonticum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*, *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, além daqueles listados no presente segmento, vindo a compor os mais relevantes membros da microbiota bucal e alguns dos patógenos mais associados às infecções de cabeça e pescoço. Como os dados ecológicos relativos aos microrganismos superinfectantes e oportunistas se estenderam aos membros da microbiota bucal citados acima, os dados das inter-relações entre eles são aqui apresentados.

A ocorrência de EBV-1 e CMV no biofilme subgengival das mães com gengivite ou periodontite foi estatisticamente mais elevada do que a observada nas mães periodontalmente saudáveis. Essa ocorrência desses vírus mostrou-se também associada à presença de outros periodontopatógenos, como *T. forsythia* ($p=0,003$), *P. gingivalis* ($p<0,001$) e *P. intermedia* ($p=0,009$), além das bactérias da família *Enterobacteriaceae* ($p=0,033$). Nas crianças, essas associações somente se

mostraram presentes para *P. intermedia* ($p= 0,041$) e aos 18 meses, em função da baixa prevalência dos demais anaeróbios Gram-negativos.

A distribuição de membros do gênero *Enterococcus* e da família *Enterobacteriaceae* mostrou relação inversa com a ocorrência dos cocos cariogênicos, ou seja, nas mães e crianças com maiores níveis de *S. mutans* e/ou *S. sobrinus* menores eram as probabilidades da detecção desses microrganismos entéricos na saliva e no biofilme (teste de correlação de Spearman, com P variando de $p=0,024$ a $p=0,003$). Também foi observado o mesmo tipo de relação inversa entre a ocorrência desses microrganismos entéricos e a presença de *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *C. rectus* (teste de correlação de Spearman, com p variando de $p= 0,045$ a $p= 0,017$).

A ocorrência de pseudomonados, o complexo da *Burkholderia cepacia*, *E. faecium*, *Helicobacter* spp., *H. pylori* e HSV-1 não mostrou associação com nenhuma das demais espécies avaliadas no presente estudo ou membros da microbiota residente na cavidade bucal.

Presença de diferentes marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos.

Os dados apresentados nas **Tabelas 13 e 14** mostram que a presença de genes de resistência a drogas antimicrobianas utilizadas com certa frequência na odontologia é comum em amostras clínicas. Entre as amostras de saliva e biofilme de crianças, os marcadores com maior distribuição foram *tet(A)*, *tet (B)*, *tet (M)* e *tet (Q)*, embora a presença de outros marcadores de resistência tenham sido observados, particularmente o gene *cfxA*, associado à resistência aos β -lactâmicos.

Nas mães esse quadro é mais complexo e apenas os genes *tet(L)*, *erm(G)* não foram detectados em alguma das amostras de saliva ou biofilme maternos, enquanto os genes *tet(S)* e *nim* foram raramente detectados. A presença de genes de resistência às tetraciclinas foi a mais disseminada e não apresentou correlação com o

uso consciente desses fármacos durante o período de realização do estudo, o mesmo ocorrendo com a presença dos marcadores *cfxA*. Verificou-se que, enquanto 69,1% das crianças cujas amostras clínicas foram coletadas não mostraram a presença de marcadores de resistência, nas mães esse percentual cai para 10,3%.

Tabela 13. Prevalência de diferentes marcadores de resistência aos antimicrobianos em amostras de saliva e biofilme oriundas de mães e crianças.

Marcadores de resistência	Crianças		Mães	
	Saliva (N=187)	Biofilme (N=119)	Saliva (N=187)	Biofilme (N=187)
<i>tet(A)</i>	7 (3,7)*	9 (7,5)	24 (12,8)	38 (20,3)
<i>tet(B)</i>	6 (3,2)	4 (3,3)	17 (9,1)	23 (12,3)
<i>tet(C)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,6)	1 (0,5)
<i>tet(D)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,1)	2 (1,1)
<i>tet(E)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (3,2)	3 (1,6)
<i>tet(G)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,1)	0 (0,0)
<i>tet(K)</i>	3 (1,6)	2 (1,7)	12 (6,4)	10 (5,3)
<i>tet(L)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>tet(M)</i>	17 (9,1)	21 (17,6)	72 (38,5)	69 (36,9)
<i>tet(O)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (2,1)
<i>tet(Q)</i>	9 (4,8)	11 (9,2)	48 (25,6)	53 (28,3)
<i>tet(S)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,5)
<i>tet(T)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (3,2)	9 (4,8)
<i>bla_{TEM}</i>	1 (0,5)	1 (0,8)	11 (5,8)	19 (10,1)
<i>bla_{CTX-M}</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,1)	2 (1,1)
<i>bla_{SHV}</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,6)	5 (2,6)
<i>cfxA</i>	2 (1,1)	4 (3,3)	19 (10,1)	36 (19,2)
<i>erm(B)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,6)	3 (1,6)
<i>erm(F)</i>	3 (1,6)	2 (1,7)	7 (3,7)	8 (4,2)
<i>erm(G)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>nim</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,1)	2 (1,1)
*N (%)				

Tabela 14. Número de crianças e mães em que foram detectadas amostras (pelo menos uma amostra por indivíduo) de genes de resistência a antimicrobianos.

Marcadores de resistência	Crianças (N=68)	Mães (N=68)
<i>tet(A)</i>	6 (7,4)	26 (38,2)
<i>tet(B)</i>	4 (5,9)	14 (20,6)
<i>tet(C)</i>	0 (0,0)	2 (2,9)
<i>tet(D)</i>	0 (0,0)	3 (4,4)
<i>tet(E)</i>	0 (0,0)	3 (4,4)
<i>tet(G)</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>tet(K)</i>	2 (2,9)	9 (13,2)
<i>tet(L)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>tet(M)</i>	12 (17,6)	41 (60,3)
<i>tet(O)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>tet(Q)</i>	7 (10,3)	32 (47,0)
<i>tet(S)</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>tet(T)</i>	0 (0,0)	4 (5,9)
<i>bla_{TEM}</i>	1 (1,4)	8 (11,7)
<i>bla_{CTX-M}</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
<i>bla_{SHV}</i>	0 (0,0)	2 (2,9)
<i>cfxA</i>	3 (4,4)	16 (23,5)
<i>erm(B)</i>	0 (0,0)	4 (5,9)
<i>erm(F)</i>	3 (4,4)	5 (7,3)
<i>erm(G)</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>nim</i>	0 (0,0)	1 (1,4)
Pacientes nos quais não foi detectado nenhum marcador de resistência aos antimicrobianos nas amostras clínicas	47 (69,1)	7 (10,3)
*N (%)		

Discussão

5 – DISCUSSÃO

A cavidade bucal e tecidos adjacentes apresentam os mais complexos e diversificados microbiomas do corpo humano em contato com o ambiente externo. Nessa área, numerosos ecossistemas estão presentes, como a superfície dental, o sulco gengival, as mucosas lisas, o dorso de língua e a orofaringe, cada qual com sua microbiota residente e microbiota suplementar características. De maneira geral, esse ambiente se encontra em condições de equilíbrio dinâmico, no qual o sistema imunológico é capaz de fazer frente às agressões a que o hospedeiro é submetido. Nessas condições, a própria microbiota bucal atua como parte da resistência inespecífica, colonizando e ocupando espaços, utilizando resíduos, ativando e estimulando a resposta imune da criança, preparando-a para desafios futuros (BERG, 1996).

Quando esse sistema entra em desequilíbrio, as infecções que geralmente ocorrem são limitadas em extensão e gravidade, em termos de letalidade e destruição tecidual, sendo que a odontologia se dedica a tratá-las e preveni-las, uma vez que a cárie, as doenças infecciosas do periodonto lateral e apical são bons exemplos dessas doenças (FENG;WEINBERG, 2006; SASSONE et al., 2008; SIQUEIRA JR, 2002).

Contudo, em pacientes que vivem em condições de profunda desnutrição (SCHAIBLE;KAUFMANN, 2007), pacientes oncológicos (YONEDA et al., 2007), condições de higiene corporal e bucal precárias (BARBOSA et al., 2001; SLOTS et al., 1991), sem o adequado saneamento básico, pacientes imunossuprimidos (BOTERO et al., 2007; DIS DIOS et al., 1993; GAETTI-JARDIM JR. et al., 2008), hospitalizados (PEDREIRA et al., 2009), entre outros, uma microbiota oportunista, constituída de microrganismos exógenos ou superinfectantes, pode se implantar e produzir enfermidades locais e sistêmicas com uma virulência não observada em membros da microbiota bucal normal e, ao contrário das infecções endógenas, em que o cirurgião dentista tem o conhecimento necessário para realizar o tratamento, essas infecções

não são necessariamente polimicrobianas e, com frequência, seus agentes etiológicos são completamente desconhecidos do cirurgião dentista.

Dessa forma, entender os fatores que facilitam a implantação desses microrganismos e, principalmente, a época em que esse processo se inicia, são de grande relevância na prevenção de sérias enfermidades que poderão atingir os portadores desses patógenos, nas décadas seguintes à sua transmissão. Nesse sentido, os “determinismos e fatalismos” não podem ser aceitos sob pena de acreditarmos na incapacidade humana de melhorar as condições de vida e educação das próximas gerações de crianças que, continuamente, se colocam nas mãos de profissionais de saúde, a qual, na boca, nem sempre se manifesta apenas como ausência de cárie ou doença periodontal, cujo estudo, obviamente, deve continuar.

Embora a microbiota associada às doenças bucais se mostre relativamente constante nas diferentes sociedades ao redor do mundo, algumas importantes particularidades geográficas, relativas a hábitos e características étnicas da população vêm sendo descritas (HAFFAJEE et al., 1994; HERRERA et al., 2008), dificultando a comparação entre os dados de sociedades poliétnicas, como a brasileira, com os dados oriundos da grande maioria dos países desenvolvidos, onde esses estudos são realizados. Como agravante, dentro da literatura consultada, o presente estudo parece ser o primeiro relato da maioria desses microrganismos na cavidade bucal de bebês, nessa faixa etária, e suas mães, em avaliação longitudinal.

Os estudos abordando a transmissão de microrganismos bucais para crianças vêm implicando a saliva como principal veículo dessa disseminação (DOGAN et al., 2008; MIYAMOTO et al., 2009; UMEDA et al., 2004), o que possivelmente também é verdadeiro para alguns patógenos não bucais, mas que podem manter colonização estável na cavidade bucal, como *H. pylori*, que pode ser encontrado com certa frequência na boca de pacientes com infecções gástricas (PARSONNET et al., 1999; ROTHENBACHER et al., 2002; SONG et al., 2000).

Entretanto, as fontes de infecção se tornam mais variadas quando os patógenos entéricos e os pseudomonados são considerados, uma vez que esses microrganismos também podem se manter no ambiente externo, por longos períodos de tempo (SCHELSTRAETE et al., 2008), como na água de abastecimento e de efluentes, ou do equipo odontológico (BARBEN;SCHMID, 2008; FUENTEFRIA et al., 2008).

Outros microrganismos são conhecidos por terem o principal habitat no solo, em rizoma de plantas, apenas produzindo quadros infecciosos em pacientes portadores de determinadas condições predisponentes, como os membros do complexo *Burkholderia cepacia*, tão freqüentemente associados às infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística, onde constituem a principal causa de óbitos (JACOBS et al., 2008; SPRINGMAN et al., 2009).

Embora o presente estudo não tenha a pretensão de avaliar a transmissão desses patógenos oportunistas, o que implicaria na genotipagem e outros métodos moleculares para determinação da origem dos microrganismos alvo, a composição da microbiota bucal das mães e dos bebês, quanto a esses organismos, mostrou boa correlação, tanto em nível de biofilme dental quanto contaminação salivar, sugerindo que a saliva reflete com certa exatidão a microbiota adjacente, podendo se converter em veículo de disseminação desses patógenos, o que já foi consolidado para microrganismos tipicamente bucais, como aqueles associados à cárie e doença periodontal (DOGAN et al., 2008; UMEDA et al., 2004). Nesse particular, deve-se esclarecer que esses microrganismos oportunistas são significativamente mais tolerantes às condições desfavoráveis que imperam fora do contato com o organismo do hospedeiro (ZEHNDER;GUGGENHEIM, 2009).

A presença desses agentes infecciosos, na saliva materna, depende da contínua remoção dos mesmos a partir da superfície do biofilme e das mucosas, uma vez que a saliva é um elemento transitório. Essa semelhança, em termos de prevalência de espécies microbianas e viruses, no biofilme e saliva, permitem a

utilização da saliva em exames para diagnóstico, mas, por outro lado, facilita a disseminação de agentes infecciosos que se alojam no biofilme e que, de outra maneira, não se propagariam facilmente. Deve-se ressaltar que a saliva oferece certa proteção ao microrganismo ou vírus, no sentido que reduz a oxidação dos mesmos e a dessecação do patógeno, o que é crítico para alguns agentes, como os víruses HSV, EBV e CMV, que são envelopados e, portanto, dependem de delicadas estruturas de superfície (adesinas), posicionadas no envoltório externo lipoprotéico, para manter sua infectividade (SLOTS, 2009).

A transmissão de um microrganismo necessita de contatos repetidos entre a fonte de infecção e o ambiente que deverá receber o patógeno, uma vez que a cavidade bucal representa um ambiente complexo, tanto em termos estruturais quanto bioquímicos, o que explicaria o longo período de contato necessário para a aquisição de alguns desses microrganismos oportunistas, em condições normais. Dessa forma, membros da família da criança são os principais envolvidos na disseminação desses agentes, como verificado para *H. pylori*, cuja transmissão entre pais e filhos vem sendo confirmada (BRAGA et al., 2007; ROTHENBACHER et al., 2002).

5.1 - Enterobacteriaceae

Alguns dos patógenos estudados, como os membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, são freqüentemente ligados a quadros de imunossupressão, falta de higiene, consumo de drogas ilícitas e infecções refratárias (BARBOSA et al., 2001; CASTRO et al., 2009; DAHLÉN, 2009; GAETTI-JARDIM JR et al., 2008a; GAETTI-JARDIM JR et al., 2008b), além de apresentar reconhecida tolerância a condições ambientais favoráveis e a antimicrobianos (CASTRO et al., 2009; SLOTS;TING, 2002), o que poderia facilitar a sua transmissão entre diferentes indivíduos.

Esses microrganismos, em particular os pseudomonados, apresentam a capacidade de se perpetuarem em ambientes pobres em nutrientes e podem facilmente ser transmitidos entre diferentes indivíduos e para o ambiente externo,

como efluentes hospitalares (FUENTEFRÍA et al., 2008) e, particularmente, clínicas odontológicas (SZYMAŃSKA et al., 2008). A presença desses microrganismos Gram-negativos, oriundos do ambiente externo e da microbiota intestinal, na cavidade bucal, é transitória, mas em indivíduos com disfunções imunológicas ou que apresentaram supressão de parte significativa da microbiota bucal, a presença dessas bactérias pode se tornar estável (DIZ DIOS et al., 1993; GONÇALVES et al., 2007) e as infecções a elas associadas tendem a ser de difícil resolução (CASTRO et al., 2009).

Em neonatos, o primeiro contato com membros da família *Enterobacteriaceae* pode se dar através do canal do parto, cesarianas (MUYTJENS et al., 1983), alimento contaminado, como o leite utilizado em unidades de tratamento intensivo, e, nessas dramáticas situações, sérias infecções neonatais, como meningites e quadros septicêmicos fatais podem se originar (ABRAMCZYK et al., 2003; MUYTJENS et al., 1983; WEIR, 2002).

Outra fonte freqüente desses microrganismos, principalmente *P. aeruginosa* e linhagens multirresistentes de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii* são as internações hospitalares, particularmente em crianças pequenas e que necessitam de respirador artificial, sendo que o ambiente bucal se mostra bastante propício, para esses patógenos, nessas condições (KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009).

A gravidade e a precocidade dessas infecções associadas à presença desses bastonetes na orofaringe têm surpreendido a medicina (ABRAMCZYK et al., 2003; KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009), que, por peculiaridades de formação daqueles que a exercem, tem dificuldade em compreender a interação entre a microbiota bucal e o hospedeiro.

Isso se torna mais relevante quando se verifica que a média de idade das crianças internadas em unidades pediátricas de tratamento intensivo, com infecções respiratórias associadas a essas enterobactérias ou que adquiriram infecções nosocomiais ligadas a esses patógenos é de 29 meses e a taxa de letalidade é de,

aproximadamente, 28% (ABRAMCZYK et al., 2003), podendo chegar a 60% quando o gênero *Acinetobacter*, um membro da família *Enterobacteriaceae*, está envolvido (ASHKENAZI et al., 1992). Esses valores são inaceitáveis sob quaisquer pontos de vista.

Em anos recentes, vários estudos têm advogado que a colonização da cavidade bucal e orofaringe por *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* pode estar intimamente ligada à ocorrência de infecções respiratórias graves em pacientes de todas as idades mantidos em unidades de tratamento intensivo (FOURRIER et al., 2000; FOURRIER et al., 2005; KOEMAN et al., 2006; KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009).

Assim, o uso de anti-sépticos bucais poderia minimizar o fenômeno, embora esse procedimento seja controverso em pediatria. Por outro lado, os dados de Pedreira et al. (2009) evidenciaram que a associação de clorexidina (0,12%) com a higiene bucal teve o mesmo efeito sobre a ocorrência desses microrganismos oportunistas quanto a higiene bucal convencional isoladamente.

Quanto aos dados sobre a ocorrência desses microrganismos, como apresentados nas **Tabelas 4 a 12**, estes se mostram inferiores aos observados na literatura citada acima. Entretanto, esses estudos acima citados não foram realizados com crianças na mesma faixa etária, neonatas ou com poucos meses de idade e, estes estariam voltados para o ambiente hospitalar, que reconhecidamente albergam extensa coleção de enteropatógenos multirresistentes a antimicrobianos. Essa exposição das crianças, nesses estudos, ao ambiente hospitalar e suas fontes de infecção cruzada por si só exacerbaria a frequência de colonização da cavidade bucal por esses patógenos entéricos e pseudomonados, o que explicaria a diferença entre a prevalência de 41% descrita por Pedreira et al. (2009) e a ocorrência desses patógenos nos bebês que participaram do presente estudo.

Por outro lado, os estudos de Kusahara et al. (2007) e Pedreira et al. (2009), com crianças de aproximadamente dois anos de idade, as quais estavam internadas

em unidades de tratamento intensivo, concordam com os dados aqui apresentados, onde observa-se que os membros da família *Enterobacteriaceae*, como um todo, seriam os principais patógenos exógenos na região de boca e orofaringe, embora suplantados por *Staphylococcus aureus* quando a comparação é feita tomando-se o táxon apenas em nível de espécie.

Por outro lado, a presença desses microrganismos também poderia representar o remanescente da microbiota adquirida durante a passagem pelo canal do parto, como mostrado por Bettelheim et al. (1974), ou até aquela adquirida no ambiente hospitalar, tanto para as crianças nascidas através de cesariana quanto por parto normal. Entretanto, a prevalência desses microrganismos tende a se reduzir com a aquisição da microbiota residente, autóctone de boca, uma vez que, por antagonismo e competição por espaço e nutrientes, os anaeróbios acabam suplantando-as. Esse processo pode ser afetado pela ocorrência de quadros de imunossupressão ou em paciente que utilizaram antimicrobianos (GAETTI-JARDIM JR et al., 2008a).

Os dados da correlação estatística entre os microrganismos aqui apresentados suportam a idéia desse antagonismo, de forma que, como a prevalência desses microrganismos foi pouco afetada ao longo do tempo e apresentaram apenas uma certa elevação entre as crianças com idade de 6 aos 18 meses, a fonte de infecção deve ter se mantido próxima às crianças e as mães constituem as principais candidatas a representar essas fontes, em função da correlação observada entre a presença desses grupos microbianos na saliva e biofilme de bebês e suas mães.

Infelizmente, no presente estudo, todas as mães podem ser consideradas como portadoras de higiene bucal deficiente, uma vez que apenas 13,2% tinham um índice de placa inferior a 50%, o que limita as comparações estatísticas sobre a importância da higiene bucal na presença desses patógenos entéricos na cavidade bucal. Contudo, desde que os resultados do presente estudo mostraram uma frequência maior de membros da família *Enterobacteriaceae* entre mães com gengivite

e periodontite, possivelmente por criar condições adequadas à proliferação microbiana, quaisquer fatores capazes de induzir inflamação gengival e gengivite podem ser considerados como predisponentes para a ocorrência de bastonetes Gram-negativos entéricos na cavidade bucal e a literatura sobre a relação entre higiene e gengivite é vasta e constitui uma realidade conhecida da população leiga.

Além desse aspecto, falta de higiene, imperfeições no tratamento de água e esgoto podem colaborar para a presença desses microrganismos na cavidade bucal (SLOTS et al., 1991). Contudo, a quase totalidade da população de Araçatuba-SP, cidade onde o projeto foi executado, é servida por rede de abastecimento de água e serviço de esgoto, o qual, inclusive, é integralmente tratado antes de ser eliminado como efluentes urbanos, minimizando a importância dessa fonte de contaminação. Por outro lado, os hábitos de crianças pequenas facilitariam o contato com o conteúdo fecal delas próprias, onde esses microrganismos são mais freqüentes (PARK et al., 2005).

Embora os valores de prevalência de membros da família *Enterobacteriaceae* tenham se mostrado relativamente baixos, principalmente na saliva das crianças com 6 meses, os bebês que pareciam albergá-los no início do estudo, geralmente foram capazes de mantê-los até o final do experimento, aos 18 meses, sugerindo que, em grande parte dessas crianças, tais microrganismos foram aptos a se tornar parte da microbiota residente ou suplementar da cavidade bucal.

Nessa linha, em estudo longitudinal de 4 anos com crianças chinesas do ensino básico, Sedgley et al. (1997) também evidenciaram a presença desses patógenos, que variaram de 25,3%, 37,0%, 24,0% a 25,8%, em valores anuais, com uma média de 27,9%, mostrando uma colonização estável. Entretanto, é possível que a idade mais elevada dessas crianças possa justificar a diferença observada com os resultados aqui apresentados, onde *Enterobacteriaceae* esteve presente em 12,7 % das amostras de biofilme dental aos 12 meses e 17,9 % aos 18 meses. A influência do

fator idade deve ser considerada quando se verifica que os resultados dessas crianças chinesas foram próximos aos observados para as mães no presente estudo.

Dentre as espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *E. sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Serratia liquefaciens* e *Serratia* sp. (GAETTI-JARDIM JR et al., 2008a; GAETTI-JARDIM et al., 2008b), além de *Enterococcus faecalis* (SOUTO; COLOMBO, 2008b), que não pertencem à essa família, se destacam pela facilidade com que se implantam no sulco gengival de pacientes com gengivite ou periodontite e isso pode, de alguma forma, facilitar o desenvolvimento de infecções nosocomiais e respiratórias ligadas a eles. A própria localização e estrutura anatômica da cavidade bucal parecem facilitar essa ligação com a árvore respiratória, propiciando condições para a disseminação dos patógenos em pacientes de todas as idades, incluindo os idosos portadores de prótese total (DANILUK et al., 2006).

Quanto à ocorrência desses microrganismos em pacientes com periodontite e gengivite, como sugerido no presente estudo, há muita controvérsias na literatura.

As enterobactérias possuem ampla capacidade metabólica e podem, através de restos teciduais e alimentares, produzir e exportar compostos capazes de induzir halitose, como o sulfeto de hidrogênio e metil-mercaptanas (SOPAPORNAMORN et al., 2006), são capazes de induzir inflamação através de potentes endotoxinas e apresentam numerosas e importantes exotoxinas, além de mecanismos de resistência a antimicrobianos (GONÇALVES et al., 2007), o que poderia colaborar para o desenvolvimento de infecções periodontais necrosantes em pacientes debilitados (GAETTI-JARDIM JR. et al., 2008a).

As frequências com que bactérias entéricas e *Pseudomonas* spp. são isoladas de pacientes com gengivite ou periodontite parecem variar entre populações, tendo sido detectadas em 14 % dos pacientes nos Estados Unidos (SLOTS et al., 1990) e em 31,2% dos portadores de periodontite e gengivite em brasileiros (BARBOSA et al., 2001). O resultados do presente estudo mostram uma ocorrência mais próxima da

relatada por Barbosa et al. (2001) e Diz Dios et al. (1993), evidenciando a presença desses patógenos entre 25% a 37% das mães com gengivite e de 33,3% a 42,8% das mães com periodontite, mas ligeiramente superiores aos relatados por Gonçalves et al. (2007), que detectaram esses microrganismos em 20% dos pacientes com periodontite crônica.

Embora a elevada frequência de detecção desses microrganismos, nas mães com inflamação periodontal, tenha sugerido a participação dos mesmos na patogênese das doenças periodontais, como sugerido por Botero et al. (2007) e Souto et al. (2006), e a ausência de dados sobre a participação quantitativa dos mesmos no biofilme não permite que se exclua a possibilidade de uma permanência transitória ou com baixas populações desses grupos bacterianos na cavidade bucal, como relatado para outras populações (BOTERO et al., 2005; BOTERO et al., 2007).

5.2 – Pseudomonados

Os pseudomonados apresentam diversas características comuns com os membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo, por vezes, a eles associados. Dentre essas espécies se destaca *P. aeruginosa*, pelo seu envolvimento em processos infecciosos nosocomiais, por possuir elevada letalidade em pacientes hospitalizados (DEFEZ et al., 2004; FURTADO et al., 2009 in press) e em infecções bucais refratárias a drogas antimicrobianas (CASTRO et al., 2009), possuindo uma extensa gama de fatores de virulência.

Dentre esses fatores destacam-se a sua mobilidade e invasividade (KIPNIS et al., 2006), a presença de endotoxina (BACKHED et al., 2003; WIELAND et al., 2002), produção de proteases (MALLOY et al., 2005; MATSUMOTO, 2004) com atividade protetora frente ao sistema imunológico e que podem colaborar na degradação de proteínas teciduais, bem como extensa gama de enzimas e toxinas capazes de atuar sobre o arcabouço de ampla variedade de tipos celulares (KONIG et al., 1997; SAWA;WIENER-KRONISH, 2004; SCHULTZ et al.,2000). Além desses fatores, existe vasta literatura sobre a resistência a drogas antimicrobianas entre esses bastonetes

Gram-negativos (FUENTEFRÍA et al., 2008; FURTADO et al., 2009 in press; WEILE et al., 2007).

Alguns estudos (COLOMBO et al., 2002; PERSSON et al., 2008) têm sugerido um papel para os membros da família *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* na etiologia da periodontite e gengivite em algumas populações, como a brasileira. Os dados aqui apresentados reforçam a idéia de que, na nossa população, a família *Enterobacteriaceae* pode, de fato, ter relação com as alterações inflamatórias periodontais, mas não suportam uma colonização persistente da cavidade bucal por *P. aeruginosa* e outros pseudomonados, independentemente da condição clínica periodontal, como observado para as mães e seus bebês.

Nesse sentido, a colonização persistente e precoce por pseudomonados, incluindo-se nessa denominação *P. aeruginosa* e outros membros desse gênero, pode constituir um dos primeiros sinais de fibrose cística em crianças (BAUSSANO et al., 2006). A presença de *P. aeruginosa* parece acelerar a deterioração das condições respiratórias desses pacientes (KOSOROK et al., 2001), enquanto sua eliminação, através de antibioticoterapia, parece retardar o processo (FREDERIKSEN et al., 1997).

Os dados apresentados pelos bebês aos 6, 12 e 18 meses de idade são consistentes de uma presença transitória de *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa* e do complexo da *Burkholderia cepacia*, na cavidade bucal. Entretanto, quase todos os estudos com bebês se referem a crianças com imunossupressão ou internadas em unidades pediátricas de tratamento intensivo (KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009), o que dificulta comparações com crianças aparentemente saudáveis e que não estão expostas a fontes de infecção tão intensas, sem considerar os fatores predisponentes para essas infecções representados pelas crianças com cateteres, sondas gástricas, mantidas em aparelhos de respiração artificial, entre outros, em ambiente hospitalar. Porém, a baixa prevalência desses microrganismos, quando comparados com a elevada frequência de detecção dos bastonetes Gram-negativos

entéricos, está de acordo com os dados de Kusahara et al. (2007), com crianças de unidades pediátricas de terapia intensiva na faixa dos 24,3 meses de idade média.

Os dados aqui apresentados também são compatíveis aos obtidos por Baltimore et al. (1989), em estudo longitudinal de 6 meses com bebês neonatos, onde a associação de espécies da família *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa* podia ser encontrada em 26% das crianças, mas se forem considerados apenas os resultados que se referem aos pseudomonados, esses se assemelham aos do presente estudo, evidenciando que esse grupo de microrganismos não faz parte da microbiota residente, tampouco da microbiota suplementar da cavidade bucal de bebês.

Nesse sentido, embora Demko et al. (1995) e Maselli et al. (2003) tenham mostrado que bebês do gênero feminino com fibrose cística sejam mais propensos a infecção por *P. aeruginosa*, os dados de Baussano et al., (2006), com bebês com essa mesma doença, e o presente estudo, com crianças aparentemente saudáveis, não encontraram quaisquer correlações entre gênero e a presença desses pseudomonados.

5.3 - *Enterococcus*

Na odontologia, o papel de microrganismos superinfetantes tem merecido destaque, particularmente quando esses microrganismos estão envolvidos em infecções refratárias, como ocorre com as infecções nosocomiais, endodônticas e periapicais associadas ao gênero *Enterococcus* (SOUTO; COLOMBO, 2008b). Dentre as espécies desse gênero, destaca-se *E. faecalis* pela sua resistência aos antimicrobianos e antibióticos, bem como pela sua prevalência na cavidade bucal (SOUTO; COLOMBO, 2008b), bem como *E. faecium*, pela sua distribuição e relevância nas infecções nosocomiais (VANKERCKHOVEN et al., 2008). Entretanto, pouco se conhece sobre a distribuição desses microrganismos em bebês e crianças pequenas.

O habitat natural dessas duas espécies de cocos Gram-positivos é o intestino grosso (COLE et al., 1999). Até recentemente e na concepção dos médicos, esses microrganismos ainda seriam considerados exógenos na cavidade bucal, onde

estariam presentes apenas em pacientes hospitalizados ou membros da equipe de saúde (CAMPBELL et al., 1983; SMYTH et al., 1987), o que não condiz com a realidade. Esses cocos, em particular *E. faecalis*, e outros microrganismos entéricos têm sido associados à periodontite em pacientes grávidas (PERSSON et al., 2008) e outros grupos (SOUTO; COLOMBO, 2008b).

Os dados aqui apresentados evidenciaram que a ocorrência de inflamação gengival pode criar condições favoráveis para uma maior colonização por *E. faecalis*, mas o número de mães com periodontite não permitiu maiores conclusões do ponto de vista estatístico. Por outro lado, *E. faecium* não foi detectado nas amostras dos bebês, enquanto sua ocorrência nas mães, independentemente das condições clínicas dessas últimas, foi bastante periférica e não apresentou correlação com os demais fatores estudados.

A detecção de *E. faecalis*, no presente estudo, não encontrou paralelo na literatura consultada, sendo que os poucos estudos que procuraram detectar esses patógenos em crianças pequenas, o fizeram em pacientes mais velhos e que seriam internados em unidades de tratamento intensivo (HUFNAGEL et al., 2007; KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009). Nesse particular, Kusahara et al. (2007) e Pedreira et al. (2009) falharam em detectar esses cocos nas crianças, resultados esses que podem ter se originado do fato de que a ênfase da coleta era a orofaringe, sem dar muita relevância ao sulco gengival, onde esses microrganismos foram encontrados com maior frequência em crianças em outros estudos realizados no laboratório (MESSIAS, 2009).

Hufnagel et al. (2007) verificaram que mais de 23% dos bebês prematuros mantidos em unidades pediátricas de tratamento intensivo tinham a mucosa retal e vaginal colonizadas por enterococos, metade das quais colonizada por *E. faecium* e, em apenas 13% das amostras, *E. faecalis*, sendo que o histórico de uso de antimicrobianos, extensão da prematuridade e o baixo peso ao nascer foram fatores que interferiram positivamente na ocorrência desses cocos. Embora esses resultados

tenham sido obtidos em condições muito diferentes das utilizadas na presente investigação, é possível que a cavidade bucal não ofereça condições apropriadas para o estabelecimento de *E. faecium*, o que não ocorreria com *E. faecalis*, desde que o mesmo é comum na cavidade bucal de diferentes populações adultas e parece se alojar preferencialmente no biofilme dental e dorso de língua (COLOMBO et al., 2002; SEDGLEY et al., 2006; SOUTO; COLOMBO, 2008b).

Enquanto os dados, para *E. faecalis*, obtidos com as mães, foram próximos aos relatados por Colombo et al. (2002), Souto et al. (2006) e Souto e Colombo (2008b), para pacientes brasileiros com diferentes condições periodontais e os mesmos foram superiores aos evidenciados por estudos com populações de outras localidades (COLOMBO et al., 2002; SEDGLEY et al., 2004; SEDGLEY et al., 2006) levantaram diversas hipóteses para explicar a maior prevalência desses microrganismos entéricos em brasileiros, como também citado no presente estudo, mas nenhuma das quais se mostrou plenamente satisfatória e esse fenômeno ainda não possui explicação e necessita ser confirmado com outras crianças e faixas etárias.

A despeito da grande ênfase que a literatura acima citada dedica à ocorrência de *E. faecalis* no biofilme dental e no biofilme que se desenvolve no interior do sistema de canais radiculares de dentes com polpa necrótica (SEDGLEY et al., 2006), o que pode sugerir que a colonização da cavidade bucal se mostra dependente da presença e número de dentes, o que não foi observado no presente estudo, os resultados aqui apresentados sugerem que as mucosas das crianças podem ser tão relevantes para a implantação desses cocos quanto a presença de dentes na cavidade bucal, o que está de acordo com os dados de Sedgley et al. (2006), os quais relataram que a língua e o biofilme seriam os maiores reservatórios de *E. faecalis* na cavidade bucal.

5.4 - *Helicobacteriaceae*

Estudos mostram que *Helicobacter pylori* é a causa mais freqüente de gastrite e úlceras gástricas e possui forte relação com alguns tipos de câncer no estômago (MEGRAUND; LAMONLIATTE, 1992; UEMURA et al., 2001), sendo freqüentemente

encontrado em países em desenvolvimento (POUNDER;NG, 1995; SACK;GYR, 1994). A aquisição desse microrganismo se dá na infância, onde a transmissão intra-familiar é bastante relevante, possivelmente entre mãe e filhos (ROTHENBACHER et al., 2002), através do contato oral-oral, gastro-oral e oro-fecal, sendo que a própria cavidade bucal poderia atuar como um reservatório (ANAND et al., 2006; BANATVALA et al., 1993; PYTKO-POLONCZYK et al., 1996; SONG et al., 1994). Entretanto, ainda não está claro o momento em que essa transmissão ocorre e se, de fato, a transmissão intra-familiar é a mais relevante (KONNO et al., 2008).

A determinação da cinética de transmissão para crianças poderia permitir avaliar os fatores associados a esse fenômeno, criando estratégias para minimizá-lo (ROWLAND et al., 2006). Desde que a maioria dos patógenos que se aloja no canal alimentar o faz precocemente, na primeira infância, onde a cavidade oral por vezes atua de forma tão ativa quanto os olhos e as mãos, no reconhecimento do mundo, é de se esperar uma colonização efetiva da cavidade bucal por *H. pylori*, nessa faixa etária. De acordo com Konno et al. (2008), 76% das crianças e pré-adolescentes colonizados, na mucosa gástrica, por esse microrganismo, compartilhavam das mesmas cepas com outros membros da família e, em 69% deles, a mãe era a portadora da linhagem predominante, sugerindo uma transmissão mãe-filho.

Alguns estudos pioneiros (ASHORN et al., 1995) evidenciaram uma baixa incidência desse patógeno, mas esse fato deriva mais das limitações das metodologias utilizadas, baseadas na cultura ou sorologia, do que reflexo da biologia do patógeno (ROWLAND et al., 2006). Outros estudos, como o de Malaty et al. (2002), evidenciaram que 4% das crianças caucasianas, com idade entre 12 e 36 meses, eram portadoras de anticorpos reativos frente a esse microrganismo e esse valor se elevava para 13% em crianças negras oriundas de famílias com as mesmas condições socioeconômicas. Nesse estudo, o percentual de incremento anual na prevalência desse bastonete foi de 1,4%, até a idade adulta, com um pico de elevação de 2,1% ao

ano em crianças com 4-5 anos, de forma que o período médio para aquisição do patógeno seria de 7,5 anos, bem acima da avaliada no presente estudo.

Os dados de Tam et al. (2008), com crianças chinesas, evidenciaram que esse patógeno é mais freqüente em crianças cujas mães apresentam educação formal modesta e mais de cinco moradores no mesmo domicílio, atingindo 13,1% entre 6 e 19 anos de idade. Entretanto, esses estudos citados anteriormente avaliam a soroconversão, de forma que não importa o local de estabelecimento do microrganismo para o resultado do teste aponte a presença dos anticorpos e evidencie o histórico de infecção prévia ou presente, dificultando comparações com os dados aqui apresentados.

Não se pode negar que a população de bebês e mães, que constituiu o grupo amostral, ilustra as modificações demográficas que a própria população brasileira vem experimentando nas últimas décadas, onde as mulheres têm um menor número de filhos e posterga a maternidade por motivos profissionais. Assim, 56% das mães exercia atividades profissionais fora da sua residência, 48% das crianças não tinham irmãos e 32% tinham um único irmão, mostrando a existência de famílias menores, o que certamente interfere com a transmissão desses microrganismos (MALATY, 2007; TAM et al., 2008).

A própria idade média das mães, de $28,35 \pm 6,58$ anos, bem como o grau de instrução, difere significativamente da observada em décadas passadas, em que a taxa de fertilidade da população brasileira era muito mais elevada (Fonte: www.ibge.gov.br) e a expansão populacional criava condições para o desenvolvimento de áreas de grande exclusão social e propícias à disseminação desses microrganismos (MALATY et al., 1996).

Assim, os dados do presente estudo foram obtidos de crianças cujas mães, em grande parte, apresentavam educação formal mediana ou superior, e as freqüências de detecção de *H. pylori* e *Helicobacter* spp. foram de 11,1% a 15,9% aos 12 meses de idade e de 16,1 a 17,9% aos 18 meses, sem mostrar influências de condições

socioeconômicas e raciais. Esses valores possivelmente estão subestimados porque não trazem informações sobre a presença desses microrganismos em outros sítios anatômicos fora da cavidade bucal e desconsidera a possibilidade de outras populações bacterianas fora do biofilme dental. Além disso, categorizar a população brasileira de acordo com a cor da pele ou a herança cultural predominante é um erro que vem se repetindo, de forma que pouca utilidade existe no conceito de “raças” ou similar nessa população.

Esses dados são semelhantes aos obtidos por Granström et al. (1997) através de métodos sorológicos, em crianças suecas, mas não se deve deixar de considerar que esse estudo também se refere à alardeada soroconversão e não à ocorrência dos patógenos na cavidade bucal.

Os dados apresentados aqui mostram uma frequência homogênea de distribuição desse microrganismo na saliva e biofilme e nada evidencia que a prevalência do mesmo vá se elevando após os 18 meses de idade. Esse dado necessita de um período maior da avaliação para ser validado, mas resultado semelhante foi obtido por Goodman et al. (2005) com crianças do sudoeste dos Estados Unidos da América e do México, evidenciando que a elevação da presença do patógeno não é homogênea em todas as populações, principalmente naquelas em que a frequência de colonização inicial se mostra elevada.

De acordo com Klein et al. (2008), esse fenômeno de flutuação na prevalência de *H. pylori* é freqüente, embora os fatores a ele associados não sejam claros. A presença desse microrganismo, em crianças a partir dos 6 meses, pode diminuir ou aumentar dependendo do nível de contaminação inicial da família, sendo mais provável que diminua entre o primeiro e o quinto ano de vida. Sem explicar satisfatoriamente esses dados, os autores ainda afirmam que os bebês do gênero masculino, nos primeiros 18 meses de idade são mais propensos a adquirir o microrganismo.

Nas mães, entretanto, a frequência de detecção de *H. pylori* foi inferior à descrita na literatura (SONG et al., 1994; LI et al., 1996; CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ et al., 2004; ANAND et al., 2006; LIU et al., 2008; LIU et al., 2009), em outras populações humanas, mas semelhantes aos resultados de Czesnikiewicz-Guzik et al. (2007), não se observando qualquer relação entre a ocorrência desse microrganismo e as condições de saúde periodontal ou existência de lesões bucais, como também observado por Berroteran et al. (2002) e Anand et al. (2006).

Em pacientes pediátricos, é muito comum que a infecção por *Helicobacter pylori* esteja associada à presença concomitante dos gêneros *Shigella* e/ou *Salmonella*, que são membros da família *Enterobacteriaceae* e comuns em toxi-infecções alimentares em crianças (SHMUELY et al 2004). Contudo, no presente estudo, do ponto de vista estatístico, não foram observadas correlações entre a presença de *Helicobacter* spp. ou *H. pylori* e quaisquer outros microrganismos.

5.5 –Complexo da *Burkholderia cepacia*

De uma forma geral, cada patógeno apresenta maior ou menor especificidade quanto à espécie ou gênero do animal hospedeiro ou planta que podem infectar e parasitar. Muitos são os casos, como observado com os vírus da poliomielite, cuja especificidade é bastante elevada, não apenas quanto à espécie animal parasitada, mas também quanto aos tipos de células nas quais os vírus são capazes de se multiplicar, o mesmo ocorrendo com o vírus CMV, EBV e HSV (SLOTS, 2009). Outros agentes infecciosos se adaptaram a novas espécies animais e, paulatinamente perdem a capacidade de infectar a espécie que outrora era parasitada, como o vírus HIV, que se adaptou inicialmente em primatas não humanos e, posteriormente atingiu o *Homo sapiens*, muito se distanciando das linhagens que infectavam o macaco verde africano (DIAMOND, 1992).

Os exemplos de elevada especificidade da relação parasita-hospedeiro são documentados e numerosos, como a relação entre *Streptococcus mutans*, hidroxiapatita e película adquirida, o que limita seu habitat a algumas áreas na

cavidade bucal de humanos e não humanos (CAUFIELD et al., 1993; TANKKUNNASOMBUT et al., 2009), ou mesmo o papel de anaeróbios obrigatório das espécies *Porphyromonas gingivalis* ou *Tannerella forsythia*, bem como o microaerófilo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, associados às periodontites humanas e raramente detectados em ambientes externos à cavidade bucal (FENG;WEINBERG, 2006).

Entretanto, nada disso parece ser muito significativo para um grupo de espécies geneticamente inter-relacionadas, mas fenotipicamente distintas, conhecidas com o nome de “complexo da *Burkholderia cepacia*”. Duas espécies se destacam na capacidade de produzir infecções: *B. cenocepacia* e *B. multivorans* (BALDWIN et al., 2008). Sua distribuição é extremamente ubíqua, sendo encontradas desde amostras de rizoma de plantas comestíveis, solos e amostras de água, além de infecções oportunistas graves, como as pneumonias em crianças portadoras de fibrose cística, sendo que o ambiente externo parece ser a principal fonte de *B. multivorans* para humanos (BALDWIN et al., 2008), enquanto a transmissão entre pessoas é reconhecidamente a forma de disseminação de *B. cenocepacia* (GOVAN et al., 1993; MAHENTHIRALINGAM et al., 2001).

No presente estudo, não foi possível identificar, em função do tempo necessário para a padronização das condições experimentais, dentro das poucas amostras positivas para esse grupo microbiano, qual das espécies estava de fato presente. Contudo, como um todo, os dados mostram que esses patógenos oportunistas não fazem parte da microbiota residente de mães e seus filhos, confirmando que a colonização precoce por esses patógenos pode, de fato, ser indicativa de condição debilitante ainda não diagnosticada (BAUSSANO et al., 2006). No presente estudo, nenhuma amostra de saliva ou biofilme dos bebês mostrou contaminação por esses microrganismos, mas entre 3 a 5 amostras de saliva e biofilme foram positivas nas mães, das cerca de 120 amostras que eram processadas, em media, após cada coleta de espécimes clínicos no estudo.

5.6 – Citomegalovírus e Epstein Barr

Os vírus da família *Herpesviridae* estão entre os mais prevalentes agentes infecciosos, atingindo praticamente toda a população até a sexta ou sétima década de vida, mesmo que de forma assintomática (YAMAMOTO et al., 1998). Os vírus HSV-1 CMV e EBV-1 vêm sendo associados com a patogênese de infecções bacterianas agudas ou agudizações de infecções bacterianas pré-existentes, na cavidade bucal, tornando-os relevantes no desenvolvimento de infecções oportunistas (SLOTS, 2009).

As infecções por CMV estão entre as principais enfermidades congênicas e pré-natais. Para as infecções congênicas, o número de neonatos atingidos varia de 0,18% a 6,2%, principalmente em populações de baixa renda e condições socioeconômicas menos favorecidas (ALFORD et al, 1990; LUCK & SHARLAND, 2009). Nesse sentido, a infecção perinatal se daria, principalmente, como resultado da aquisição do vírus durante o parto ou aleitamento materno, tendo sido freqüente em nosso país, onde atingia de 5% a 40% das crianças (ALFORD et al., 1990; MACHADO et al., 1991). Essas infecções congênicas podem acarretar uma ampla gama de seqüelas como distúrbios de desenvolvimento, alterações neurológicas e surdez, enquanto a severidade das infecções neonatais é bastante variável (LUCK;SHARLAND, 2009; YAMAMOTO et al., 1998).

As crianças que participaram do presente estudo não apresentavam os sinais e sintomas de infecção congênicas ou neonatais, que estão amplamente descritas nos estudos de Luck e Sharland (2009) e Yamamoto et al. (1998) mas não se pode afirmar que casos de infecção neonatal não tenham existido, a despeito dos cuidados com a mãe durante o período gestacional e a realização de exames laboratoriais, os quais podem produzir pequena margem de resultados falso negativos e falso positivos (YAMAMOTO et al., 1998).

Na mesma forma, a utilização da saliva para diagnóstico de infecção pelo CMV não é um método padrão, visto que a quantidade de vírus nesse meio é pequena se comparada com a urina e o sangue do paciente, particularmente na infecção

congenita, onde a concentração viral torna-se mais elevada do que a observada em adultos (STAGNO;PASS, 1983).

Em adultos portadores, onde esse vírus se mantém em estado de latência em linfócitos e outras células, produzindo uma viremia relativamente pequena, a quantidade de vírus na saliva seria insatisfatória para o diagnóstico laboratorial em cultura de células, métodos sorológicos ou por PCR, caso a infecção inicial tivesse ocorrido há alguns meses. Em outras condições, como infecções mais antigas, a presença desses agentes na saliva ou biofilme seria fruto de hemorragias em pacientes com viremia significativa ou replicação viral nos tecidos que margeiam a cavidade bucal (SLOTS, 2009).

Por outro lado, o vírus Epstein-Barr é bastante freqüente na saliva de pacientes infectados, constituindo seu maior veículo de disseminação. As amostras de saliva e biofilme das mães, que se mostraram portadoras do vírus CMV, quase sempre albergavam conjuntamente o vírus EBV-1, possivelmente pela semelhança em termos estruturais, o que condiciona, em grande parte, a sensibilidade a desinfetantes e ressecamento, bem como as características de sua transmissão (SAYGUN et al., 2008; SLOTS et al., 2006; SLOTS, 2009).

A despeito de estudos que mostram a soroconversão de crianças, em vários países, por esses agentes infecciosos (AARNISALO et al., 2003; GHEBREKIDAN et al., 1999), pouco se sabe sobre os fatores que poderiam condicionar um aumento da presença desses vírus no sulco gengival de crianças pequenas e na saliva. Nos países em desenvolvimento, a aquisição desses vírus é bastante precoce, enquanto nos países desenvolvidos, a transmissão por vezes se dá na puberdade (NILSSON et al., 2009).

Os vírus herpéticos, em geral, e os vírus CMV e EBV, em particular, podem predispor à ocorrência de infecções oportunistas por facilitar a exposição de novos receptores na superfície das células do hospedeiro, além de induzir a liberação de IL-10 por monócitos, reduzindo a expressão das moléculas do complexo de

histocompatibilidade principal do tipo II, indispensável para a resposta imune humoral e celular (MORGENSEN;PALUDAN, 2001).

Como consequência, ocorreria uma redução da capacidade fagocítica de macrófagos e a capacidade de gerar radicais oxidativos (MORGENSEN;PALUDAN, 2001), além de induzir a liberação de IL-6 por fibroblastos e IL-1 β e TNF- α a partir de monócitos, além de outros peptídeos com importante atividade pró-inflamatória, que poderiam estar ligadas ao início de processos infecciosos em que o componente inflamatório se mostra proeminente (BOTERO et al., 2008b; MORGENSEN;PALUDAN, 2001; WARA-ASWAPATI et al., 2003)

Alguns estudos sugerem que a ativação das infecções pelo CMV e EBV-1, simultaneamente, poderia criar um estado de imunossupressão local e levar à reativação de outras infecções herpéticas latentes, como as associadas ao vírus herpes simples, além de exacerbar o quadro inflamatório das infecções bacterianas, como as gengivites ou periodontites (BOTERO et al., 2007b; SAYGUN et al., 2008; SLOTS et al., 2006).

Assim, a associação estatística entre esses vírus e a ocorrência de periodontite e gengivite, nas mães, pode estar ligada aos fenômenos descritos acima, enquanto que a inflamação poderia criar condições favoráveis para patógenos mais resistentes aos componentes do sistema complemento e outros mecanismos de defesa do hospedeiro, como algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, o que poderia explicar a associação detectada entre esses vírus e microrganismos entéricos. Outros patógenos com atividade proteolítica, como *P. gingivalis* e *T. forsythia*, também mostraram essa associação e são capazes de reativar infecções herpéticas (SUGANO et al., 2004) e de degradar anticorpos e proteínas do sistema complemento (ELEY;COX, 2003)

Kaye et al., (2008) estudaram a transmissão vertical do CMV entre mães e filhos, mostrando a presença desse vírus em 3.9% dos recém nascidos. A positividade aumentou significativamente uma vez que a quase totalidade das mães infectadas

pelo agente viral eliminava partículas virais nas secreções exócrinas, como o colostro. Os dados desses autores sobre a prevalência de CMV em mães (36%) foram semelhantes à média observada entre as mães que participaram do presente estudo e que tinham gengivite, mas não podemos comparar de maneira adequada essas informações pela ausência de uma descrição pormenorizada da condição periodontal das pacientes do estudo acima.

Os dados apresentados, relativos aos CMV nas mães com periodontite crônica ou gengivite, são semelhantes aos observados por Botero et al. (2008a) e Wu et al. (2007b). Entretanto, alguns estudos não observaram relação entre CMV e periodontite ou gengivite (ROTOLA et al., 2008; WATANABE et al., 2007). Da mesma forma, a ocorrência de EBV-1 nas mães com gengivite ou periodontite crônica se mostrou semelhante à relatada por outros estudos com pacientes com periodontite (CHALABI et al., 2008; KLEMENC et al., 2005; SAYGUN et al., 2008) e gengivite (CHALABI et al., 2008).

Embora alguns estudos procurem associar o vírus HSV-1 com a severidade da doença periodontal em humanos (KAMMA et al., 2000), sugerindo que a co-infecção com vírus CMV poderia estar ligada com o aumento da profundidade clínica de sondagem, sangramento e perda de inserção em pacientes com pouco acúmulo de biofilme microbiano (LING et al., 2004). Entretanto, existem poucas evidências sobre qualquer participação mais efetiva desse agente na periodontite ou gengivite (SAYGUN et al., 2008), o qual não foi detectado na saliva ou biofilme dos bebês e foi raramente observado nas mães, não mostrando relações com quaisquer parâmetros estudados, diferentemente do relatado por Imbronito et al. (2008b), onde esses vírus se mostraram associados às formas mais agressivas de periodontite.

Entretanto, o papel desempenhado por esses vírus herpéticos nas infecções bucais precisa ser mais bem avaliado, posto que a presença dos mesmos, nos tecidos periodontais, pode não estar necessariamente ligada à origem dessas enfermidades, mas apenas refletir a presença de mais sangue no sulco gengival inflamado e bolsa

periodontal, quando comparado com indivíduos sadios, ou mesmo a presença de linfócitos portadores desses vírus nos tecidos periodontais (SUNDE et al., 2008). Essa hipótese merece ser considerada, uma vez que o “*nested*” PCR é a metodologia mais sensível para a detecção desses agentes e pode detectar poucas cópias do genoma viral no tecido, mesmo em quantidades que provavelmente não teriam maiores implicações clínicas (WARA-ASWAPATI et al., 2003).

5.7 - Genes de Resistência

O advento dos antimicrobianos com toxicidade seletiva representou um marco na história recente da humanidade, possibilitando o tratamento de enfermidades até então associadas a elevadas taxas de mortalidade. Entretanto, diversos fatores, como seu uso indiscriminado, automedicação, mutações e disseminação vertical e horizontal de genes de resistência, levaram à proliferação de microrganismos capazes de sobreviver em contato com esses fármacos (ROBERTS, 1996; ROBERTS, 1998), poucos anos após a purificação desses últimos. Assim, “uma corrida atrás da própria cauda” teve início, como novas drogas sendo desenvolvidas e, a seguir, identificação de bactérias capazes não apenas de sobreviver a elas, mas também com a possibilidade de transferir essa capacidade para microrganismos outrora sensíveis.

Dentre os microrganismos que apresentam maior resistência aos antimicrobianos destacam-se os membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, além dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, entre os microrganismos anaeróbios facultativos e aeróbios (ROBERTS, 1998; PEDREIRA et al., 2009), além de *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* (algumas espécies reclassificadas e posicionadas em gêneros como *Parvimonas*; Ex. *P. micra*) *Prevotella* e *Fusobacterium* entre os anaeróbios obrigatórios (GAETTI-JARDIM Jr. et al., 2007; HANDAL et al., 2005; PIGRAU et al., 2007).

Em função da participação desses microrganismos em múltiplas infecções, com mortalidade elevada, especialmente em unidades pediátricas de terapia intensiva (KUSAHARA et al., 2007; PEDREIRA et al., 2009), muitos programas de controle têm

procurado minimizar a disseminação desses patógenos resistentes e os efeitos devastadores que causam em pacientes com necessidades especiais.

Estudos periódicos têm fornecido dados satisfatórios sobre a susceptibilidade a antimicrobianos desses patógenos oportunistas, em avaliações que, por vezes, ganham dimensões nacionais e acabam por considerar não apenas os isolados de origem humana, mas também animal e mesmo amostras ambientais (PITOUT et al., 2005; SILVA et al., 2007). Contudo, poucos relatos descrevem a susceptibilidade a antimicrobianos desses organismos isolados da cavidade oral humana (BARBOSA et al., 2001; GAETTI-JARDIM JR. et al., 2007), onde os mesmos apresentam a capacidade de produzir as mais sérias infecções ligadas à região de cabeça e pescoço. Como agravante, a falta de informações sobre os determinantes genéticos associados a essa resistência é pronunciada, especialmente para as linhagens e espécies mais freqüentes na cavidade bucal, que não despertam o interesse da classe médica, tampouco dos cirurgiões dentistas.

Dentre as drogas antimicrobianas mais empregadas ao redor do mundo, os β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e os monobactâmicos estão entre os mais prescritos em todo o mundo (JACOBY, 2006). Em patógenos Gram-negativos, as β -lactamases são os mais importantes fatores de resistência a β -lactâmicos, e sua crescente prevalência e evolução alarmante parecem estar diretamente relacionadas com a utilização clínica destas drogas (JACOBY, 2006; PITOUT et al., 2005). Na cavidade bucal, a produção dessas enzimas está associada principalmente ao gene *cfxA*, o qual apresenta diferentes alelos, como *cfxA1* e *cfxA2*, proeminentes entre as espécies dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, anaeróbios obrigatórios da microbiota bucal (GIRAUD-MORIN et al., 2003).

Entre os patógenos oportunistas mais ligados às infecções bucais, como as enterobactérias, a produção dessas enzimas está ligada a uma extensa miríade de genes diferentes, notadamente os ligados à família *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}. Os resultados das tabelas 13 e 14 evidenciam que a presença de amplicons compatíveis

com o gene *bla*_{TEM} nas amostras de saliva e biofilme das mães foi mais elevada do que a apresentada para os demais genes que codificam para as β -lactamases com maior espectro de ação, as quais estiveram presentes nas mesmas amostras em que membros da família *Enterobacteriaceae* foram detectados.

Os resultados aqui apresentados, relativos ao gene *cfxA*, cuja presença foi detectada em 19,2% e 10,1% das amostras de biofilme e saliva das mães, respectivamente, sugerem que esse gene esteja ligado a membros da microbiota bucal normal dessas pacientes.

Nesse sentido, os dados relativos à ocorrência de microrganismos da microbiota anaeróbia dessas mesmas pacientes, os quais constituíram parte da tese de doutoramento de Karine Takahashi, mostram a presença de bactérias do gênero *Prevotella*, notadamente *P. intermedia*, em 18,9% das amostras de bebês e em 50% das amostras de biofilme subgengival das mães, sendo que esses microrganismos são, de fato os principais reservatórios desse gene na cavidade bucal (GIRAUD-MORIN et al., 2003; IWAHARA et al., 2006). Nas crianças esses genes foram raramente detectados, o mesmo ocorrendo com os gêneros microbianos que costumam albergá-los.

Embora não se possa atribuir a esses microrganismos a presença desses marcadores, a literatura revela que os mesmos são os principais reservatórios dessa classe de genes (SPANU et al., 2002). Esses genes das famílias *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} são marcadores de resistência que codificam para enzimas capazes de degradar penicilinas e cefalosporinas, principalmente (PITOUT et al., 2005), que constituem o cerne da terapêutica com antimicrobianos em odontologia.

A transmissão de bactérias resistentes entre indivíduos é um evento descrito detalhadamente, porém genes de resistência ou mutações que conferem esse fenótipo, somente constituem vantagem na presença de agentes antimicrobianos, no ambiente, uma vez que o microrganismo é obrigado a desviar parte do seu metabolismo para sobreviver em contato com a droga, consumindo nutrientes e

energia nessas atividades. Na ausência dessas drogas, os microrganismos sensíveis proliferam mais rapidamente do que os resistentes, de forma a recompor lentamente o perfil original de susceptibilidade a antibióticos da microbiota (ROBERTS, 1996; ROBERTS 1998).

Nesse sentido, mesmo que a maioria dos genes de resistência tenha sido detectada em amostras de saliva e biofilme das mães, possibilitando a disseminação dos mesmos para os bebês, se as progenitoras fossem educadas a evitar a automedicação e os profissionais de saúde fossem disciplinados a empregar esses fármacos de forma mais restrita, esse fenômeno de transmissão de microrganismos resistentes seria, inevitavelmente, suplantado pelo desenvolvimento da microbiota normal desses bebês, perdendo importância clínica.

As opções terapêuticas para as infecções causadas por organismos Gram-negativos expressando β -lactamases são limitadas pelo fato desses microrganismos serem geralmente resistentes a maioria dos fármacos desse grupo, com exceção dos carbapenêmicos (PÉREZ-PÉREZ;HANSON 2002).

Como agravante, entre os genes que codificam para as β -lactamases, apenas uma pequena parcela dos mesmo foi avaliada, de forma que não foram abordadas as alterações de permeabilidade de membrana externa e modificações conformacionais nas proteínas de ligação à penicilina (PLPs), alvo da ação dessas drogas (LIVERMORE et al., 1995). Assim, muitos outros marcadores devem estar presentes nas amostras estudadas.

Alguns gêneros microbianos, como *Enterococcus*, destacando-se *E. faecium*, são intrinsecamente mais resistentes à penicilina e a ampicilina. Nesses cocos, a resistência à ampicilina se dá em função da presença da proteína de ligação à penicilina no. 5 (PLP5), a qual apresenta baixa afinidade por essas drogas (RICE et al., 2004).

Os mais comuns determinantes genéticos de resistência a tetraciclina são representados pelos genes *tet*, que podem ser separados em genes que codificam

para bombas protéicas de e fluxo da droga [especialmente genes *tet* (A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(I), *tet*(K) e *tet*(L)], genes associados á proteção ribossomial [genes *tet*(M) *tet*(F) *tet*(Q)], e gene *tet*(X) que codifica para uma proteína capaz de inativar as moléculas da droga (ROBERTS et al., 1996). Em cocos Gram-positivos, a presença concomitante de dois ou mais marcadores *tet* é comum (ROBERTS 1998).

Em microrganismos bucais, os principais marcadores de resistência a essas drogas são os genes *tet*(M) e *tet* (Q), embora os genes *tet*(W) *tet*(Q) *tet*(O) *tet*(S) também tenham sido detectados em microrganismos bucais (VILLIDIEU et al., 2003).

Nas enterobactérias, os mais comuns marcadores de resistência a tetraciclina são os genes *tet* (A) e *tet* (B) (AMINOV et al.2001; MACAULEY et al. 2007; NG et al., 2001; RAMOS et al. 2009 – in press; ROBERTS et al., 1996). Nos *enterococos*, os marcadores de resistência aos genes *tet*(K) e *tet*(M) representou 58,62% do detectados.

No presente estudo, genes *tet* puderam ser detectados tanto em crianças como em suas mães, mas nessas últimas a diversidade de marcadores foi surpreendente. No Brasil, a tetraciclina e seus derivados são empregados rotineiramente no preparo de rações para frangos de engorda (PESSANHA;GONTIJO FILHO, 2001), o que explicaria a grande disseminação de genes de resistência a essas drogas em todos os grupo microbianos, praticamente condenando o uso sistêmico desses fármacos à história da medicina e odontologia.

Os macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) e lincosaminas (clindamicina e lincomicina) compartilham de receptores muito próximos na superfície da subunidade 50S do ribossomo bacteriano, de forma que freqüentemente a mutação de um único gene pode elevar a resistência bacteriana às duas classes de drogas (ROBERTS, 2002). Além desse aspecto, a resistência às lincosaminas como um todo, principalmente para alguns isolados do gêneros *Streptococcus* e *Bacteroides* (GAETTI-JARDIM JR et al., 2007a; GAETTI-JARDIM JR. et al., 2007b), pode estar relacionada à presença de genes *erm* (PUMBWE et al., 2007). Entretanto, as

lincosaminas, em particular a clindamicina, permanecem como drogas de escolha no tratamento de infecções sérias em odontologia, principalmente nas infecções anaeróbias mistas (RUSH et al., 2007).

A maioria dos microrganismos resistentes a essas drogas na cavidade bucal é portadora do gene *ermB* ou *ermF*, embora *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Campylobacter rectus* também possam ser detentores do marcador *ermC*, sendo que esse último também é freqüente em cocos anaeróbios facultativos dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (ROBERTS, 1998). Os dados da Tabela 13 evidenciam maior ocorrência desses genes (*ermB* e *ermF*) nas mães, sendo que apenas o gene *ermF* foi detectado nos bebês.

Os nitroimidazóis se tornaram as drogas mais utilizadas no tratamento das infecções anaeróbias mistas, tão freqüentes em periodontia, endodontia e cirurgia buco-maxilo-facial. Sua efetividade frente a bactérias anaeróbias Gram-negativas é substancial (KURIYAMA et al., 2007), mas amostras clínicas dos gêneros *Bacteroides* (TRINH;REYSSET, 1996) e *Prevotella* (MORY et al., 2005). A resistência a esses compostos depende dos genes *nim*, destacando-se os genes *nimA*, *nimB*, *nimC* e *nimD*, que conferem resistência de nível moderado a elevado (ROBERTS, 1998).

Esses genes estão presentes em plasmídeos, transposons e mesmo no cromossomo bacteriano, e codificam para uma enzima denominada 5'-nitroimidazol redutase, que converte o nitroimidazol em um derivado 5'-aminoimidazólico, inativo (Reysset et al., 1996). Nas amostras de biofilme e saliva de mães e crianças, o gene *nim* praticamente não foi detectado, uma vez que apenas 1,1% das amostras clínicas maternas se mostraram positivas para o mesmo. Esses dados evidenciam a possibilidade do uso do metronidazol como coadjuvante no tratamento de infecções eminentemente anaeróbias, como as gengivites necrosantes.

Conclusão

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo, uma vez analisados, permitiram as seguintes conclusões:

- A) dentre os microrganismos estudados, os cocos do gênero *Enterococcus* e, em particular *E. faecalis*, bem como a família *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter* spp. e *H. pylori* são freqüentes na microbiota bucal das mães e parcela significativa de seus bebês, dos 6 aos 18 meses de idade;
- B) a ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae*, do gênero *Enterococcus* e *E. faecalis* foi mais elevada em mães com inflamação periodontal, o mesmo ocorrendo com o Citomegalovírus e o vírus Epstein-Barr tipo 1;
- C) a ocorrência de *Helicobacter* spp. e *H. pylori* não mostra preferência por tecidos periodontais inflamados e esses microrganismos foram os mais prevalentes nas mães e um dos mais freqüentes nos bebês, tanto na saliva quanto no biofilme;
- D) a saliva de mães portadoras de gengivite e periodontite apresentam maior prevalência desses microrganismos, em relação ao observado com as mães periodontalmente saudáveis;
- E) o complexo da *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus faecium*, o vírus herpes simples tipo 1, bem como *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* foram raramente detectados na saliva e biofilme de mães e seus bebês;
- F) a ocorrência desses microrganismos não mostrou correlação com condições socioeconômicas e de dieta alimentar;
- G) genes de resistência aos β -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos e lincosaminas foram observados nas amostras clínicas de saliva e biofilme microbiano, tanto de bebês quanto de suas mães.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Aarnisalo J, Ilonen J, Vainionpää R, Volanen I, Kaitosaari T, Simell O. Development of antibodies against cytomegalovirus, varicella-zoster virus and herpes simplex virus in Finland during the first eight years of life: a prospective study. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(10):750-3.

Abramczyk ML, Carvalho WB, Carvalho ES, Medeiros EA. Nosocomial infection in a pediatric intensive care unit in a developing country. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(6):375-80.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229-35.

Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol 2000.* 2002;29:207-22.

Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 7: S745-53.

Al-Tawfiq JA, Antony A, Abed MS. Antimicrobial resistance rates of *Enterobacter* spp.: a seven-year surveillance study. *Med Princ Pract.* 2009;18(2):100-4.

Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):22-32.

Anand PS, Nandakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with *Helicobacter pylori* infection? J Periodontol. 2006;77(4):692-8.

Ashorn M, Mäki M, Hällström M, Uhari M, Akerblom HK, Viikari J, et al. *Helicobacter pylori* infection in Finnish children and adolescents. A serologic cross-sectional and follow-up study. Scand J Gastroenterol. 1995;30(9):876-9.

Ashkenazi S, Leibovici L, Samra Z, Konisberger H, Drucker M. Risk factors for mortality due to bacteremia and fungemia in childhood. Clin Infect Dis. 1992;14(4):494-51.

Backhed F, Normark S, Schweda EK, Oscarson S, Richter-Dahlfors A. Structural requirements for tlr4-mediated LPS signalling: a biological role for lps modifications. Microbes Infect. 2003;5(12):1057–63.

Bágyi K, Haczku A, Márton I, Szabó J, Gáspár A, Andrási M, et al. Role of pathogenic oral flora in postoperative pneumonia following brain surgery. BMC Infect Dis. 2009;9:104.

Baldwin A, Mahenthiralingam E, Drevinek P, Pope C, Waine DJ, Henry DA, et al. Elucidating global epidemiology of *Burkholderia multivorans* in cases of cystic fibrosis by multilocus sequence typing J Clin Microbiol. 2008;46(1):290-95.

Banatvala N, Lopez CR, Owen R, Abdi Y, Davies G, Hardie J, Feldman R. *Helicobacter pylori* in dental plaque. Lancet. 1993;341(8841):380.

Baltimore RS, Duncan RL, Shapiro ED, Edberg SC. Epidemiology of pharyngeal colonization of infants with aerobic Gram-negative rod bacteria. J Clin Microbiol. 1989;27(1):91-5.

Barben J, Schmid J. Dental units as infection sources of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur Respir J. 2008;32(4):1122-3.

Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 2001;16(5):306-10.

Baussano I, Tardivo I, Bellezza-Fontana R, Forneris MP, Lezo A, Anfossi L, Castello M, Aleksandar V, Bignamini E. Neonatal screening for cystic fibrosis does not affect time to first infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Pediatrics. 2006;118(3):888-95.

Belaouaj A, Lapoumeroulie C, Caniça MM, Vedel G, Névot P, Krishnamoorthy R, et al. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiol Lett. 1994;120(1-2):75-80.

Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol. 1996;4(11):430-5.

Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi C, Goncalvez R, et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. J Med Microbiol. 2002;51(9):764-70.

Bettelheim KA, Breadon A, Faiers MC, O'Farrell SM, Shooter RA. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. J Hyg. 1974;72(1):67-70.

Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. J Periodontol. 2005;76(9):1490-5

Botero JE, Arce RM, Escudero M, Betancoutrh M, Jaramillo A, Contreras A. Frequency of detection of periodontopathic and superinfecting bacteria in HIV-positive patients with periodontitis. J Int Acad Periodontol. 2007;9(1):13-8.

Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. J Periodontol. 2007;78(4):696-704.

Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial co-infection in periodontitis. J Periodontol. 2007b;78(12):2303-10.

Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parras B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. Oral Microbiol Immunol. 2008a;23(3):239-44.

Botero JE, Contreras A, Parra B. Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection. *Oral Microbiol Immunol*. 2008b;23(4):291-8.

Braga AB, Fialho AM, Rodrigues MN, Queiroz DM, Rocha AM, Braga LL. *Helicobacter pylori* colonization among children up to 6 years: results of a community-based study from Northeastern Brazil. *J Trop Pediatr*. 2007;53(6):393-7.

Brunner E, Langer F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. *Biom J*. 2000;42(6):663-75.

Campbell J, McGowan DA, Macfarlane TW. The prevalence of enterococci in the dental plaque of chronic hospital patients. *Br J Oral Surg*. 1983;21(3):171-4.

Castro AL, Vieira EM, Arêde LT, Jardim Júnior EG. Infection of keratocystic odontogenic tumour by *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(1):157.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of *Mutans Streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*. 1993;72(1):37-45.

Chalabi M, Moghim S, Mogharehabed A, Najafi F, Rezaie F. EBV and CMV in chronic periodontitis: a prevalence study. *Arch Virol*. 2008;153(10):1917-9.

Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H, et al. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(5):1248-50.

Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):443-9.

Cole MF, Bryan S, Evans MK, Pearce CL, Sheridan MJ, Sura PA, et al. Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life.. *Infect Immun.* 1999;67(4):1878-86.

Colombo APV, Telles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém WJ, Mendes MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2002;73(4):360-9.

Cunha RF, Delben ACB, Percinoto C, Saito TE. Dentistry for babies: a preventive protocol. *ASDC J Dent Child.* 2000;67(2):89-92.

Cunha RF, Percinoto C, Delben ACB. Tratamento integral do bebê: manipulação e controle. In: Cardoso RJA, Machado MEL. *Odontologia, conhecimento e arte: odontopediatria, ortodontia, ortopedia funcional dos maxilares, pacientes especiais.* São Paulo: Artes Médicas;2003.p.71-6.

Czesnikiewicz-Guzik M, Loster B, Bielanski W, Guzik TJ, Konturck PC, Zapala J, et al. Implications of oral *Helicobacter pylori* for the outcome of its gastric eradication therapy. *J Clin Gastroenterol.* 2007;41(2):145-51.

Czeńnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielański W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, et al. Association of the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and in the stomach. J Physiol Pharmacol. 2004;55 Suppl 2:105-15.

Dahlén G. Non-odontogenic infections in dentistry. Periodontol 2000. 2009;49:7-12.

Dahlén G. Bacterial infections of the oral mucosa. Periodontol 2000. 2009a;49:13-38.

Daniluk T, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicha D, et al. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. Adv Med Sci. 2006;51 Suppl 1:86-90.

Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N, Gouby A, Mahamat A, Daurev JP, et al. Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection. J Hosp Infect. 2004;57(3):209-16.

Demko CA, Byard PJ, Davis PB. Gender differences in cystic fibrosis: *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Clin Epidemiol. 1995;48(8):1041-9.

Diamond J. The mysterious origin of AIDS. Nat Hist. 1992;101(9):25-9.

Diz Dios P, Feijoo J, Alvarez FJ, Catro M, Varela J. Oral *Enterobacteriaceae* in HIV patients. Int Conf AIDS 1993;9:436.

Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. J Periodontol. 2003;74(6):803-14.

Dogan B, Kipalev AS, Okte E, Sultan N, Asikainen SE. Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. J Periodontol. 2008;79(2):307-15.

Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, et al. Real-time polymerase chain reaction to determine the prevalence and copy number of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in subgingival plaque at individual healthy and periodontal disease sites. J Periodontol. 2009;80(7):1133-40.

Eley BM, Cox SW. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. Periodontol 2000. 2003;31:105-24.

Fraiz FC, Walter LRF. Study of factors associated with dental caries in children who receive early dental care. Pesqui Odontol Bras. 2001;15(3):201-7.

Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. Periodontol 2000. 2006;40:50-76.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009;155(Pt6):1749-57.

Fourrier F, Cau-Pottier E, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Jourdain M, Chopin C. Effects of dental plaque antiseptic decontamination on bacterial colonization and nosocomial infections in critically ill patients. Intensive Care Med. 2000; 26(9):1239-47.

Fourrier F, Dubois D, Pronnier P, Herbecq P, Leroy O, Desmettre T, et al. Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections

acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. Crit Care Med. 2005;33(8):1728–35.

Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol. 2005;20(5):289-95.

Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 1997;23(5):330–5.

Friskien KW, Higgins T, Palmer JM The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. Oral Microbiol Immunol. 1990;5(1):43-5.

Frisso GM, Bezerra ACB, Toledo AO. Correlação entre hábitos alimentares e cárie dentária em crianças de 6 a 36 meses de idade. JBP J Bras Odontopediatr Odontol Bebê. 1998;1(2):17-26.

Fuentefria DB, Ferreira AE, Graf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(5):470-3.

Furtado GHC, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, et al. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. J Crit Care. In Press 2009.

Gaetti-Jardim Jr E, Zelante F, Avila-Campos MJ. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. J Dent. 1996;24(5):345-8.

Gaetti-Jardim Jr E, Landucci LF, Lins SA, Vieira EM, Oliveira SR. Susceptibility of strict and facultative anaerobes Isolated from endodontic infections to metronidazole and β -lactams. J Appl Oral Sci. 2007;15(6):539-45.

Gaetti-Jardim Jr E, Nakano V, Wahasugui TC, Cabral FC, Gamba R, Avila-Campos MJ. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of hiv-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. Braz J Microbiol. 2008a; 39(2):257-61.

Gaetti-Jardim Jr E, Marcelino SL, Sukekava F. Ocorrência de bactérias entéricas em amostras de biofilme subgengival de pacientes com gengivite, periodontite crônica ou periodontite agressiva. Rev. Periodontia 2008b;18:92-8.

Gaetti-Jardim Jr E, Marcelino SL, Feitosa ACR, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. J Med Microbiol. In press 2009.

Granström M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. J Clin Microbiol. 1997;35(2):468-70.

Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(4):277-80.

Ghebrekidan H, Rudén U, Cox S, Wahren B, Grandien M. Prevalence of herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus, and varicella-zoster virus infections in Eritrea. *J Clin Virol.* 1999;12(1):53-64.

Giraud-Morim C, Madinier I, Fosse T. Sequence analysis of *cfxA2* - like β -lactamases in *Prevotella* species. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(5):1293–6.

Goodman KJ, O'Rourke K, Day RS, Wang C, Nurgalieva Z, Phillips CV, et al. Dynamics of *Helicobacter pylori* infection in a US-Mexico cohort during the first two years of life. *Int J Epidemiol.* 2005;34(6):1348-55.

Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, Pereira GA, Pereira JÁ, Mattos-Guaraldi AL, et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol.* 2007;44(5):488-94.

Govan JR, Brown PH, Maddison J, Doherty CJ, Nelson JW, Dodd M, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet.* 1993;342(8862):15-9.

Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23(2):148-57.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.

Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. FEMS Microbiol Lett. 2005;242(2):319-24.

Haraszthy VI, Lally ET, Haraszthy GG, Zambon JJ. Molecular cloning of the fur gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun. 2002;70(6):3170-9.

Helovu H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. Oral Microbiol Immunol. 1993;8(2):75-9.

Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol. 2008;35(2):106-13.

Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, Berner R, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. BMC Infect Dis. 2007;7:107.

Imbronito AV, Grande SR, Freitas NM, Okuda O, Lotufo RF, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. J Oral Sci. 2008a;50(1):25-31.

Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. J Periodontol. 2008b;79(12):2313-12.

Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S, Williams DW, Yanagisawa M, Nakagawa K, et al. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the beta-lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2006;44(1):172-6.

Jacobs JL, Fasi AC, Ramette A, Smith JJ, Hammerschmidt R, Sundin GW. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. Appl Environ Microbiol. 2008;74(10):3121-9.

Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem- hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. J Clin Microbiol. 2006;44(6):1971-6.

Kamma JJ, Diamanti-Kipioti A, Nakou M, Mitsis FJ. Profile of subgingival microbiota in children with primary dentition. J Periodontal Res. 2000;35(1):33- 41.

Kaye S, Miles D, Antoine P, Burny W, Ojuola B, Kaye P, et al. Virological and immunological correlates of mother-to-child transmission of cytomegalovirus in The Gambia. J Infect Dis. 2008;197(9):1307-14.

Karajannis MA, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. Blood. 1997;89(8):2856-62.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J Clin Microbiol. 1999;37:3497-503.

Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*. 2006;94(1):10-21.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006;36(2):78–91.

Klein PD, Gilman RH, Leon-Barua R, Diaz F, Smith EO, Graham DY. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol*. 1994;89(12):2196 – 200.

Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. *J Clin Virol*. 2005;34(2):147-52.

Koeman M, van der Ven AJ, Hak E, Joore HC, Kaasjager K, de Smet AG, et al. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(12):1348–55.

König B, Vasil ML, König W. Role of hemolytic and nonhemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* for inflammatory mediator release from human granulocytes. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;112(2):115–24.

Konno M, Yokota S, Suga T, Takahashi M, Sato K, Fujii N. Predominance of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by random amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis in Japanese families. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(11):999-1003.

Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol*. 2001;32(4):277–87.

Kubar A, Saygun I, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J Periodontal Res*. 2005;40(2):97-104.

Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(4):285–8.

Kusahara D, Peterlini MAS, Pedreira MLG. Children's oropharyngeal colonization upon admission at a pediatric intensive care unit. *Acta Paul Enferm*. 2007;20(4):421-7.

Lamell CW, Griffen AL, McClellan DL, Leys EJ. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1196-9.

Levin L, Baev V, Lev R, Stabholz A, Ashkenazi M. Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel. *J Periodontol*. 2006;77(8):1392-6.

Li C, Ha T, Ferguson DA Jr, Chi DS, Zhao R, Patel NR, et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig Dis Sci*. 1996;41(11):2142-9.

Ling LJ, Ho CC, Wu CY, Chen YT, Hung SL. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75(11):1479-85.

Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557–84.

Liu Y, Lin H, Bai Y, Qin X, Zheng X, Sun Y, et al. Study on the relationship between *Helicobacter pylori* in the dental plaque and the occurrence of dental caries or oral hygiene index. Helicobacter. 2008;13(4):256-60.

Liu Y, Yue H, Li A, Wang J, Jiang B, Zhang Y, et al. An epidemiologic study on the correlation between oral *Helicobacter pylori* and gastric H. pylori. Curr Microbiol. 2009;58(5):449-53.

Llena C, Forner L. Dietary habits in a child population in relation to caries experience. Caries Res. 2008;42(5):387- 93.

Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I Prevalence and severity. Acta Odont Scand. 1963;21:533-51.

Löfmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2006;58(6):1160-7.

Luck S, Sharland M. Congenital cytomegalovirus: new progress in an old disease. Paediatr Child Health. 2009;19(14):178-84.

Lundström AM, Sundaeus V, Bölin I. The 26-kilodalton, AhpC homologue, of *Helicobacter pylori* is also produced by other *Helicobacter* species. Helicobacter, 2001;6(1):44-54.

Macauley JJ, Adams CD, Mormile MR. Diversity of tet resistance genes in tetracycline resistant bacteria isolated from a swine lagoon with low antibiotic impact. *Can J Microbiol*. 2007;53(12):1307-15.

Machado CM, Fink MC, Boas LS, Sunita LM, Weinberg A, Shiguematsu K, et al. Infecção perinatal pelo citomegalovirus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991;33(2):159-66.

Madinier IM, Fosse TM, Monteil RA. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *J Periodontol*. 1997;68(1):2-6.

Mahenthiralingam E, Vandamme P, Campbell ME, Henry DA, Gravelle AM, Wong LT, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1469–75.

Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1994;35(6):742-5.

Malaty HM, Kim JG, Kim SD, Graham DY. Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high Prevalence in Adults. *Am J Epidemiol*. 1996;143(3):257-62.

Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY, Miller CC, Reddy SG, Srinivasan SR, et al. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet*. 2002;359(9310):931-5.

Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007;21(2):205-14.

Malheiros VJ, Ávila-Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. Rev Saúde Pública. 2004;38(5):40-6.

Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright Jr. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005;288(2):L409–18.

Maselli JH, Sontag MK, Norris JM, Mackenzie T, Wagener JS, Accurso FJ. Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. Pediatr Pulmonol. 2003;35(4):257–62.

Matsumoto K. Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. Biol Chem. 2004;385(11):1007–16.

Mcdowell A, Mahenthiralingam E, Moore JE, Dunbar KE, Webb AK, Dodd ME, et al. PCR-based detection and identification of *Burkholderia cepacia* complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2001;39(12):4247-55.

Mégraud F, Lamouliatte H. *Helicobacter pylori* and duodenal ulcer. Evidence suggesting causation. Dig Dis Sci. 1992;37(5):769-72.

Messias LPA. Ocorrência de microrganismos periodontopatogênicos e víruses herpéticos na cavidade bucal de pacientes portadores de síndrome de down

[dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista;2009.

Melhado FL. Avaliação de um programa de prevenção aplicado em crianças de 5 a 8 anos de idade provenientes da Bebê-Clínica da F.O.A.- UNESP [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista;2003.

Menezes EA, As KM, Cunha FA, Angelo MRF, Oliveira IRN, Salviano MNC. Frequency and susceptibility percentile of bacteria isolated in patients assisted in the intensive care unit of the General Hospital of Fortaleza .J Bras Patol Med Lab. 2007;43(3):149-55.

Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. J Periodontol. 2000;71(6):981-8.

Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. J Periodontal Res. 2005;40(2):147-54.

Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, et al. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. Arch Oral Biol. 2009;54(4):374-79.

Morgensen TH, Paludan SR. Molecular pathways in virus induced cytokine production. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65(1):131-50.

Mory F, Carlier JP, Alauzet C, Thouvenin M, Schuhmacher H, Lozniewski A. Bacteremia caused by a metronidazole-resistant *Prevotella* sp. strain. J Clin Microbiol. 2005;43(10):5380–3.

Muytjens HL, Zanen HC, Sonderkamp HJ, Kollée LA, Wachsmuth IK, Farmer JJ 3rd. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. J Clin Microbiol. 1983;18(1):115–20.

Munro CL, Grap MJ. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. Am J Crit Care. 2004;13(1):25-34.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 4th ed. Wayne:NCCLS;1997.

Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline-resistant genes. Mol Cell Probes. 2001;15(4):209-15.

Nguyen AM, El-Zaatari FAK, Graham DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;79(6):705-9.

Nilsson C, Larsson Sigfrinius AK, Montgomery SM, Sverremark-Ekström E, Linde A, Lilja G, et al. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus are differentially associated with numbers of cytokine-producing cells and early atopy. Clin Exp Allergy. 2009;39(4):509-17.

Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. J Clin Periodontol. 2002;27(10):763-8.

O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE. The plaque control record. J Periodontol. 1972;43(1):38-56.

Panchabhai TS, Dangayach NS, Krishnan A, Kothari VM, Karnad DR. Oropharyngeal cleansing with 0.2% chlorhexidine for prevention of nosocomial pneumonia in critically ill patients. Chest. 2009;135(5):1150-6.

Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, et al. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. J Microbiol. 2005;43(4):345-53.

Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and Oral Shedding of *Helicobacter pylori* From Healthy Infected Adults. JAMA. 1999;282(23):2240-5.

Paterson DL. Serious infections in the intensive care unit: *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Clin Infect Dis. 2006;43(52):S41–2.

Pedreira MLG, Kusahara DM, Carvalho WB, Núñez SC, Peterlini MAS. Oral care interventions and oropharyngeal colonization in children receiving mechanical ventilation. Am J Crit Care. 2009;18(4):319-28.

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(6):2153-62.

Persson GR, Hitti J, Paul K, Hirschi R, Weibel M, Rothen M, et al. *Tannerella forsythia* and *Pseudomonas aeruginosa* in subgingival bacterial samples from parous women. J Periodontol. 2008;79(3):508-16.

Pessanha RP, Gontijo Filho PP. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de *Enterobacteriaceae* lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. Arq Bras Med Vet Zootec. 2001;53(1):111-5.

Pigrau C, Almirante B, Rodriguez D, Larrosa N, Bescos S, Raspall G, et al. Osteomyelitis of the jaw: resistance to clindamycin in patients with prior antibiotics exposure. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;29(4):317-23.

Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005;43(7):3129-35.

Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther. 1995;9 suppl 2:33-9.

Pumbwe L, Wareham DW, Aduse-Opoku J, Brazier JS, Wexler HM. Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. Clin Microbiol Infect. 2007;13(2):183-9.

Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielański W, Kaczmarczyk-Stachowska A. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. J Physiol Pharmacol. 1996;47(1):121-9.

Quiding-Järbrink M, Bove M, Dahlén G. Infections of the esophagus and the stomach. *Periodontol* 2000. 2009;49(2):166-78.

Rajendran R, Rajeev R, Anil S, Alaseah M, Rabi AG. *Helicobacter pylori* coinfection is a confounder, modulating mucosal inflammation in oral submucous fibrosis. *Indian J Dent Res*. 2009;20(2):206-11.

Ramfjord SP. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J Periodontol*. 1959;30:51-9.

Ramos MMB, Gaetti-Jardim EC, Gaetti-Jardim Jr E. Resistance to tetracycline and β -lactams and distribution of resistance markers in enteric microorganisms and pseudomonads isolated from the oral cavity. *J Appl Oral Sci*. In press. 2009.

Reysset G, Trinh S, Carlier, Sebald M. Base genetiques de la resistance aux 5-nitroimidazoles des *Bacteroides* spp. *Med Mal Infect*. 1996;26:S213-9.

Rice LB, Bellais S, Carias LL, Hutton-Thomas R, Bonomo RA, Caspers P, et al. Impact of specific pbp5 mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8):3028-32.

Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 1996;19(1):1-24.

Roberts MC. Antibiotic resistance in oral/respiratory bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):522-40.

Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol Biotechnol*. 2002;20(3):261-83.

Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, Adler G, Brenner H. Role of infected parents in transmission of *helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21(7):674-9.

Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, et al. Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):831-7.

Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2006;130(1):65-72.

Rush DE, Abdel-Haq N, Zhu JF, Aamar B, Malian M. Clindamycin versus unasyn in the treatment of facial cellulites of odontogenic origin in children. *Clin Pediatr*. 2007;46(2):154-9.

Ryan KJ, Ray CG, editors. Sherris medical microbiology. 4th ed. New York. McGraw Hill. 2004. p.294–5.

Sack B, Gyr K. *Helicobacter pylori* in the developing world. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1994;12(2):144-5.

Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J*. 2008;41(6):508-15.

Sawa T, Wiener-Kronish JP. A therapeutic strategy against the shared virulence mechanism utilized by both *Yersinia pestis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Anesthesiol Clin North America*. 2004;22(3):591–606.

Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2008;43(3):352–9.

Schaible UE, Kaufmann SHE. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*. 2007;4(5):e115.

Schelstraete P, Van Daele S, De Boeck K, Proesmans M, Lebecque P, Leclercq-Foucart J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2008;31(4):822-9.

Schultz MJ, Speelman P, Zaat SA, Hack CE, van Deventer SJ, van der Poll T. The effect of *Pseudomonas* exotoxin a on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29(3):227–32.

Sedgley CM, Samaranayake LP, Chan JCY, Wei SH. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12(3):183-8.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(2):95-101.

Shmueli H, Samra Z, Ashkenazi S, Dinari G, Chodick G, Yahav J. Association of *Helicobacter pylori* infection with *Shigella* gastroenteritis in young children. Am J Gastroenterol. 2004;99(10):2041-5.

Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont Scand. 1964;22:121-35.

Siqueira Jr JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94(3):281-93.

Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol. 2007;60(1):166-76.

Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol 1990;5(6):305-8.

Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus–*Porphyromonas gingivalis*–periodontitis axis. J Periodont Res. 2003;38(3):318–23.

Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. J Periodontol. 1991;62(9): 543-7.

Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. J Periodont Res. 2006;41(4):235-44.

Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontol 2000. 2002;28:106-76.

Slots J. Oral viral infections of adults. *Periodontol 2000*. 2009;49:60-86.

Slots J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(3):278-83.

Slots J. *Herpesviruses* in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2005;38:33-62.

Smyth CJ, Halpenny MK, Ballagh SJ. Carriage rates of *enterococci* in the dental plaque of haemodialysis patients in Dublin. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1987;25(1):21–33.

Soler P, Herrera S, Rodríguez J, Cascante J, Cabral R, Echeita-Sarriondia A, et al. Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype Kedougou infection in infants linked to infant formula milk, Spain, 2008. *Euro Surveill*. 2008;13(35):pii:18963.

Song QS, Zheng ZT, Yu H. *Helicobacter pylori* in the dental plaque. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 1994;33(7):459-61.

Song Q, Haller B, Schmid RM, Adler G, Bode G. *Helicobacter pylori* in dental plaque: a comparison of different PCR primer sets. *Dig Dis Sci*. 1999;44(3):479-84.

Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol*. 2000;49(4):349-53.

Sopapornamorn P, Ueno M, Vachirarojpisan T, Shinada K, Kawaguchi Y. Association between malodor and measurements obtained using a new sulfide monitor. *J Dent*. 2006;34(10):770-4.

Souto R, Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol.* 2006;37(3):208-15.

Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol.* 2008;53(2):155-60.

Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):196-202.

Spilker T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2074-9.

Springman AC, Jacobs JL, Somvanshi VS, Sundin GW, Mulks MH, Whittam TS, et al. Genetic diversity and multihost pathogenicity of clinical and environmental strains of *Burkholderia cenocepacia*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(16):5250-60.

Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Seminars in Perinatol.* 1983;7(1):31-42.

Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Idesawa M, Tanaka H, Sato S, et al. Relationship between *Porphyromonas gingivalis*, Epstein-Barr virus infection and reactivation in periodontitis. *J Oral Sci.* 2004;46(4):203-6.

Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? J Med Virol. 2008;80(6):1007-11.

Szymańska J, Sitkowska J, Dutkiewicz J. Microbial contamination of dental unit waterlines Ann Agric Environ Méd. 2008;15(2):173-9.

Tam YH, Yeung CK, Lee KH, Sihoe JD, Chan KW, Cheung ST, et al. A population-based study of *Helicobacter pylori* infection in Chinese children resident in Hong Kong: prevalence and potential risk factors .Helicobacter. 2008;13(3):219-24.

Tankunnasombut S, Youcharoen K, Wisuttisak W, Vichayanrat S, Tiranathanagul S. Early colonization of mutans streptococci in 2- to 36- month old Thai children. Pediatr Dent. 2009;31(1):47- 51.

Thylstrup A, Fejervik O. Cariologia clínica. 3. ed. São Paulo:Santos, 2001.

Trinh S, Reyssset G. Detection by PCR of the *nim* genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *bacteroides* spp. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2078–84.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakidom, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med. 2001;345(11):784-9.

Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, Ishizuka M, Huang Y, Noguchi K, et al. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. J Periodontal Res. 2004;39(6):398-404.

Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Van der Weijden GA, et al. Java Project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol*. 2006;33(8):540-8.

Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, et al. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(14):4247-55.

Villedieu A, Diaz-Torres ML, Hunt N, McNab R, Spratt DA, Wilson M, et al. Prevalence of Tetracycline Resistance Genes in Oral Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):878–82.

Wara-Aswapati N, Boch JA, Auron PE. Activation of interleukin 1beta gene transcription by human cytomegalovirus - Molecular mechanisms and relevance to periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(2):67-71.

Watanabe SA, Correia-Silva Jde F, Horta MC, Costa JE, Gomez RS. EBV-1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. *Braz Oral Res*. 2007;21(4):336-41.

Weile J, Schmid RD, Bachmann TT, Susa M, Knabbe C. DNA microarray for genotyping multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(3):325–38.

Weir R. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *CMAJ*. 2002;166(12):1570

Williams RC, Barnett AH, Claffey N, Davis M, Gadsby R, Kellett M, et al. The potential impact of periodontal disease on general health: a consensus view. *Curr Med Res Opin.* 2008;24(6):1635-43.

Wu YM, Yan J, Ojcius DM, Chen LL, Gu ZY, Pan JP. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *J Clin Microbiol.* 2007;45(11):3665-70.

Yamamoto AY, Aquino VH, Figueiredo LTM, Mussi-Pinhata MM. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(1):19-26.

Yoneda S, Imai S, Hanada N, Yamazaki T, Senpuku H, Ota Y, et al. Effects of oral care on development of oral mucositis and microorganisms in patients with esophageal cancer. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60(1):23-8.

Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J.* 2009;42(4):277-87.

Anexos

8. ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 158/2006
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 19 de setembro de 2006.

Referência Processo FOA 2006-01470

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável do relator que analisou o projeto "AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL DE BEBÊS AOS 6, 18 E 30 MESES DE IDADE E SUA RELAÇÃO COM DIETA ALIMENTAR, CONDIÇÃO GENGIVAL, ERUPÇÃO DENTÁRIA E PREVALÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA" expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado relatórios parciais em 14/09/2007, 14/09/2008 e o relatório final em 14/09/2009.

Prof. Dr. Stefan Fiuza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. ROBSON FREDERICO CUNHA
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.

19/9/06

Dr. Robson Frederico Cunha

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (16) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO B

QUESTIONÁRIO - CRIANÇA

Nome: _____
Filiação: MÃE: _____
PAI: _____
Endereço: _____
Bairro: _____ CEP: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Tel. Res.: _____ Cel.: _____

1 – Instrumento de coleta de dados

1.1 – Tipo: Formulário

1.2 – Nº (Quanto a aplicação): _____

1.3 – Data: ____/____/____

1.4 – Nº do prontuário na Bebê-Clínica: _____

2 – Entrevistado (Responsável pelo paciente)

1. ☐ Mãe 2. ☐ Pai 3. ☐ Avó (ô) 4. ☐ Tia (o) 5. ☐ Outro _____

2.1 – A criança vive com quem? Passa mais tempo com quem da família?

3 – Fatores socioeconômico – culturais

3.1 – Dados da criança

3.1.1 – Sexo: () M () F

3.1.2 – Data de nascimento ____/____/____

3.1.3 – Idade _____

3.1.4 – Naturalidade _____

3.1.5 – Estado _____

3.1.6 – Quantos irmãos a criança tem ?

1. ☐ Primogênito 2. ☐ Segundo 3. ☐ Terceiro 4. ☐ Quarto ou mais 5. ☐ Filho único

3.2 – Escolaridade

3.2.1 – Quantos anos de estudos completaram os pais da criança? (incluir apenas os anos aprovados):

Mãe	
☐	1. sem escolaridade
☐	2. 1º grau incompleto
☐	3. 1º grau completo
☐	4. 2º grau incompleto
☐	5. 2º grau completo
☐	6. nível superior incompleto
☐	7. nível superior completo

Pai	
☐	1. sem escolaridade
☐	2. 1º grau incompleto
☐	3. 1º grau completo
☐	4. 2º grau incompleto
☐	5. 2º grau completo
☐	6. nível superior incompleto
☐	7. nível superior completo

3.3 – Profissão

3.3.1 - Quais as respectivas profissões dos pais ?

Mãe: _____

Pai: _____

3.3.1 - Quais as ocupações dos pais nos últimos 12 meses?

Mãe: _____

Pai: _____

3.4 – Renda

3.4.1 – Quantas pessoas que moram na sua casa trabalharam no mês passado?

3.4.2 – Qual a renda mensal do chefe da família? (a pessoa que é responsável pela família), (incluindo salário, pensão, auxílio doença, aposentadoria, etc.):

R\$ _____ reais (_____ salários mínimos)

3.4.3 – Entre as outras pessoas que moram na casa e trabalharam no mês passado, quanto cada uma recebeu no final do mês passado? (excluir o chefe da família)

Pessoa 1 – Recebeu R\$ _____ reais, (_____ salários mínimos)

Pessoa 2 – Recebeu R\$ _____ reais, (_____ salários mínimos)

Pessoa 3 – Recebeu R\$ _____ reais, (_____ salários mínimos)

3.4.5 – Contando com você, quantas pessoas da família dependem dessa renda total?

4 – Hábitos de Higiene Bucal

4.1 – Realiza a limpeza na boca do bebê ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ As vezes

4.2 – Com o que realiza a higiene ? _____

4.3 – Quantas vezes ao dia realiza a higiene?

1. ☐ Uma 2. ☐ Duas 3. ☐ Três 3. ☐ Quatro 4. ☐ Não realiza todos os dias

4.4 - Utiliza o fio dental ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ As vezes

4.5 – Quantas vezes ao dia utiliza o fio dental ?

1. ☐ Uma 2. ☐ Duas 3. ☐ Três 4. ☐ Não realiza todos os dias

4.6 – Quem realiza a higiene bucal da criança ? _____

5 - Hábitos de Alimentação

5.1 – Amamentação

1. ☐ Somente Peito 2. ☐ Somente Mamadeira 3. ☐ Peito e mamadeira

5.2 - Se mamadeira, esta contém: _____

1. ☐ Dorme mamando 2. ☐ Acorda a noite para mamar 3. ☐ Não tem este hábito

5.3 - Tem contato com outros tipos de alimentos:

Tipos de alimentos			Período		Frequência da alimentação			
			Nas refeições	Entre as refeições	Rara	Diária (nº de dias)	Semanal (nº de dias)	Não tem o hábito
N Ã O R E T E N T.	Chá	C/ açúcar						
		S/ açúcar						
	Suco	C/ açúcar						
		S/ açúcar						
	Refrigerante	Normal						
		Diet						
	Leite	C/ açúcar						
		S/ açúcar						
	Outras							
R E T E N T.	Papinhas							
	Frutas							
	Bolacha e Biscoito							
	Iogurte							
	Doces							
	Outros							

5.4 - No momento da alimentação você tem o hábito de assoprar a comida antes de dá-la para a criança?

6 – Fatores associados com o desenvolvimento de problemas bucais, na concepção dos pais:

6.1 – Mesmo tendo todos os cuidados necessários com a saúde bucal do seu filho, em algum momento da vida seu filho vai ter um dente cariado ?

1. ☐ Sim, eu acho 2. ☐ Não, eu não acho 3. ☐ Não sei

6.2 – Você acha que é importante cuidar do dente de leite do seu filho, mesmo sabendo que ele vai ficar pouco tempo na boca e que outro vai nascer no seu lugar ?

1. ☐ Sim, eu acho 2. ☐ Não, eu não acho 3. ☐ Não sei

7 – Saúde geral da criança:

7.1 - Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

7.2 - Qual? _____

7.3 - Toma algum medicamento diariamente? () Sim () Não

7.4 - Qual? _____

7.5 - Tomou algum medicamento recentemente? () Sim () Não

7.6 - Qual? _____

7.7 - Há quanto tempo? _____

8 - Exame clínico intrabucal:

8.1 - Tecidos moles: _____

1º COLETA – 6 meses

Paciente estava tomando alguma medicação? () Sim () Não

Qual ? _____

Estava com algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Data:				Idade da Criança:			
50		60		70		80	
51		61		71		81	
52		62		72		82	
53		63		73		83	
54		64		74		84	
55		65		75		85	

2º COLETA – 12 meses

Paciente estava tomando alguma medicação? () Sim () Não

Qual ? _____

Estava com algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Data:				Idade da Criança:			
50		60		70		80	
51		61		71		81	
52		62		72		82	
53		63		73		83	
54		64		74		84	
55		65		75		85	

3º COLETA – 18 meses

Paciente estava tomando alguma medicação? () Sim () Não

Qual ? _____

Estava com algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Data:				Idade da Criança:			
50		60		70		80	
51		61		71		81	
52		62		72		82	
53		63		73		83	
54		64		74		84	
55		65		75		85	

ANEXO C

QUESTIONÁRIO - MÃE

Nome: _____
Data de Nascimento: ____/____/____ Mãe da criança: _____

1 – Hábitos de Higiene Bucal

1.1 – Quantas vezes por dia você escova seus dentes?

1. ☐ Uma 2. ☐ Duas 3. ☐ Três 3. ☐ Quatro 4. ☐ Não realiza todos os dias

1.2 - Utiliza o fio dental ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ As vezes 4. ☐ Não utiliza

1.3 – Quantas vezes ao dia utiliza o fio dental ?

1. ☐ Uma 2. ☐ Duas 3. ☐ Três 4. ☐ Não utiliza todos os dias

1.4 – Faz uso de algum enxaguatório bucal ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ As vezes 4. ☐ Não utiliza

1.5 - Quando escova seus dentes, há sangramento gengival ?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ As vezes 4. ☐ Não acontece

1.6 - Quando e onde foi sua última visita ao dentista ? _____

1. ☐ Particular 2. ☐ Público 3. ☐ Instituições de ensino 4. ☐ Não foi

1º COLETA – 6 meses

A mãe faz uso de alguma medicação diariamente ? () Sim () Não

Qual ? _____

Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Utilizou algum tipo de medicamento recentemente? () Sim () Não

Qual ? _____

Exame intrabucal:

Tecidos moles: _____

Data:				Identificação:			
11		21		31		41	
12		22		32		42	
13		23		33		43	
14		24		34		44	
15		25		35		45	
16		26		36		46	
17		27		37		47	
18		28		38		48	

2º COLETA – 12 meses

A mãe faz uso de alguma medicação diariamente ? () Sim () Não

Qual ? _____

Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Utilizou algum tipo de medicamento recentemente? () Sim () Não

Qual ? _____

Exame intrabucal: _____

Tecidos moles: _____

Data:				Identificação:			
11		21		31		41	
12		22		32		42	
13		23		33		43	
14		24		34		44	
15		25		35		45	
16		26		36		46	
17		27		37		47	
18		28		38		48	

3º COLETA – 18 meses

A mãe faz uso de alguma medicação diariamente ? () Sim () Não

Qual ? _____

Tem algum problema de saúde? () Sim () Não

Qual ? _____

Utilizou algum tipo de medicamento recentemente? () Sim () Não

Qual ? _____

Exame intrabucal: _____

Tecidos moles: _____

Data:				Identificação:			
11		21		31		41	
12		22		32		42	
13		23		33		43	
14		24		34		44	
15		25		35		45	
16		26		36		46	
17		27		37		47	
18		28		38		48	

ANEXO D**DIÁRIO ALIMENTAR**

INÍCIO: ____/____/_____ TÉRMINO: ____/____/_____

	2º feira	3º feira	4º feira	5º feira	6º feira	Sábado	Domingo
Café da manhã							
Lanche							
Almoço							
Lanche							
Jantar							
Ceia							