

Detecção de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva e colostro

Streptococcus mutans detection in saliva and colostrum samples

Camilla Beatriz da Silva¹, Marcelly Milhomem Mendes¹, Bárbara Rocha Rodrigues¹, Thiago Lima Pereira¹, Denise Bertulucci Rocha Rodrigues¹, Virmondes Rodrigues Junior², Virginia Paes Leme Ferriani³, Vinicius Rangel Geraldo-Martins¹, Ruchelee Dias Nogueira^{1,3}

¹ Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

² Universidade Federal Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil.

³ Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein_journal/2019A04515

RESUMO

Objetivo: Detectar *Streptococcus mutans* no colostro e na saliva de recém-nascido, e comparar com a detecção na saliva da mãe. **Métodos:** Foram incluídos no estudo 43 mulheres saudáveis, com gestações a termo e sem complicações, que tiveram cesariana eletiva, e seus recém-nascidos. As amostras foram investigadas por reação de polimerase em cadeia para a detecção de *S. mutans* em material genético extraído das amostras. **Resultados:** Cerca de 16% das amostras de colostro apresentaram *S. mutans*, não sem correlação com a presença das bactérias em ambas amostras de saliva. *S. mutans* foi detectado em 49 e 30% das amostras de saliva das mães e recém-nascidos, respectivamente. Houve correlação positiva na detecção de *S. mutans* entre os tipos de saliva. O número de amostras de saliva materna com *S. mutans* detectável foi menor nas mulheres que receberam tratamento odontológico durante a gravidez. A escovação três vezes ao dia influenciou na detecção do *S. mutans* tanto no saliva quanto no colostro. **Conclusão:** Embora a saliva materna possa apresentar *S. mutans*, poucas amostras de colostro apresentam a bactéria. A presença de bactéria na saliva de neonatos pode estar relacionada ao contato antes do nascimento. O tratamento odontológico e os hábitos de higiene parecem influenciar na detecção de *S. mutans* em amostras de saliva e colostro maternos.

Descritores: *Streptococcus mutans*; Saliva; Colostro

ABSTRACT

Objective: To detect *Streptococcus mutans* in colostrum and saliva of neonates and compare with its detection in saliva of mothers. **Methods:** Forty-three healthy women, full-term gestations with no complications, submitted to elective Cesarean section, and their newborns were included in the study. Samples were investigated by polymerase chain reaction to detect *S. mutans* in genetic material from the samples. **Results:** Approximately 16% of colostrum samples showed *S. mutans*, but not correlated with the presence of the bacteria in both samples of saliva. *S. mutans* was detected in 49 and 30% of saliva samples of mothers and neonates, respectively. There was a positive correlation in *S. mutans* detection between types of saliva. The number of maternal samples of saliva with detectable *S. mutans* was smaller in women receiving dental treatment during pregnancy. Tooth brushing, three times a day, influenced the detection of *S. mutans* in both the saliva and the colostrum. **Conclusion:** Although maternal saliva may present *S. mutans*, few samples of colostrum present the bacteria. The presence of bacteria in neonate saliva may be related to contact before birth. Dental treatment and hygiene habits seem to influence the detection of *S. mutans* in samples of maternal saliva and colostrum.

Keywords: *Streptococcus mutans*; Saliva; Colostrum

Como citar este artigo:

Silva CB, Mendes MM, Rodrigues BR, Pereira TL, Rodrigues DB, Rodrigues Junior V, et al. Detecção de *Streptococcus mutans* em amostras de saliva e colostro. *einstein* (São Paulo). 2019;17(1):eAO4515. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019A04515

Autor correspondente:

Ruchelee Dias Nogueira
Avenida Nenê Sabino, 1.801 – Universitário
CEP: 38055-500 – Uberaba, MG, Brasil
Tel.: (34) 3319-8800
E-mail: ruchelee_nogueira@yahoo.com.br

Data de submissão:

5/4/2018

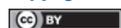
Data de aceite:

17/8/2018

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2019



Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

INTRODUÇÃO

O gênero *Streptococci* representa a maioria das bactérias que colonizam a cavidade oral nos primeiros meses de vida.⁽¹⁾ A colonização inicial de *Streptococcus mutans* ocorre principalmente após a erupção dentária e está associada ao desenvolvimento de cáries. As bactérias *S. mutans* colonizam a superfície dentária, acumulam-se no biofilme e produzem ácidos que promovem a desmineralização do esmalte dentário.⁽²⁾ A cárie é uma doença infecciosa e um problema de saúde pública, especialmente no Brasil, pois as crianças são colonizadas por *S. mutans* precocemente, mesmo antes da erupção dos dentes.⁽³⁾ A colonização precoce pode estar associada a alto consumo de sacarose, contato com indivíduos altamente infectados⁽⁴⁻⁶⁾ e imaturidade do sistema imunológico das mucosas em crianças.^(7,8)

A aquisição e o estabelecimento iniciais dos microrganismos ocorrem por meio de uma sucessão microbiana que depende de hábitos, contato com outros indivíduos e alimentação. O aleitamento materno é prática comum no Brasil, e investigação acerca dos componentes do colostro se faz necessária. Sabe-se que o colostro tem grande diversidade bacteriana,⁽⁹⁾ incluindo *Streptococci*, *Staphylococci*, bactérias do ácido láctico e bifidobactérias,⁽¹⁰⁾ que podem determinar a colonização do organismo de crianças amamentadas. A microbiota intestinal de crianças que passaram pelo aleitamento é rapidamente invadida por bifidobactérias^(11,12) e, mais tarde, com suplementação alimentar, é colonizada predominantemente por *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Bacteroides* e *Clostridium*.⁽¹¹⁾

O colostro possui diversas propriedades que beneficiam os recém-nascidos, pois é importante fonte de componentes nutricionais e imunológicos.^(13,14) Os benefícios do leite materno em diversas infecções respiratórias e intestinais já foram amplamente descritos, mas, em relação à cárie, são controversos e ainda não estão claros. Há evidências de que as cáries representem um desfecho negativo associado ao aleitamento, devido ao aumento de cáries em períodos mais longos de amamentação.^(15,16) Por outro lado, sugere-se que períodos reduzidos de amamentação estejam associados ao aumento no risco de cáries precoces.⁽¹⁷⁾

Estudos anteriores sobre análise imunológica de colostro de mulheres brasileiras relataram altos níveis de imunoglobulina A contra *S. mutans* e seus antígenos de virulência, o que poderia contribuir para a modulação de infecções por *S. mutans*.^(18,19) Porém, há poucas informações com relação à contribuição do colostro na composição da colonização oral.

OBJETIVO

Avaliar a presença de *Streptococcus mutans* em amostras de colostro, compará-las com amostras de saliva de mães e dos recém-nascidos, e associar os achados a dados sobre saúde oral.

MÉTODOS

Trata-se de estudo observacional com recém-nascidos e mães saudáveis, que deram consentimento para participar. O Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo aprovou o estudo, CAAE: 02166713.4.0000.5145. Mulheres multiparas voluntárias foram incluídas no estudo e submetidas a exame dentário, apresentando boa saúde sistêmica e oral (sem cáries ou doença periodontal). Foram submetidas a cesárea eletiva para gestação a termo. Foram excluídos do estudo recém-nascidos com malformações congênitas, hipóxia perinatal, hemorragia intracraniana, peso ou altura incompatíveis com idade gestacional, ou em antibioticoterapia. As informações sobre história pregressa e gestacional foram obtidas por entrevista com a mãe. As instruções sobre a higiene oral e materna foram dadas após as coletas. Todos os voluntários (mães e recém-nascidos) foram encaminhados para seguimento na Clínica Odontológica da universidade. Um total de 43 amostras foram elegíveis, de 203 coletadas de mães que deram à luz na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e passaram por exame na cavidade oral.

Coleta de amostras

No primeiro dia de internação, as gestantes foram entrevistadas e passaram por exame da cavidade oral; as amostras de saliva não estimulada foram coletadas. A saliva dos recém-nascidos foi coletada logo após o nascimento e antes de qualquer contato com a mãe, incluindo a primeira mamada, para evitar-se contaminação por componentes não salivares. As amostras de saliva foram coletadas com pipetas de transferência de polipropileno. Foi adicionada solução de EDTA de 250mM, pH 5.2 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) a cada amostra antes do transporte em gelo para o laboratório, onde foi armazenada a -80°C até a análise.

As amostras de colostro foram coletadas por expressão manual em tubos Falcon de polipropileno estéril, no primeiro dia de lactação. Após a coleta, as amostras foram transportadas em gelo ao laboratório, centrifugadas a 1.300g, por 5 minutos, e armazenadas a -80°C até o momento dos procedimentos laboratoriais.

Detecção de *Streptococcus mutans* nas amostras

O DNA foi extraído com o *kit* PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-BIO, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, as amostras foram incubadas com solução de lisozima de 20mg/mL⁻¹ (Sigma, Tóquio, Japão), contendo 50mM de Tris-HCl (pH 8,0) e EDTA de 20mM, e incubadas a 37°C, por 30 minutos. As amostras foram imediatamente transferidas para um tubo Eppendorf de 1,5mL, com *bead solution*. Após, foi feita agitação em vórtex por 2 minutos para obter a suspensão bacteriana, que foi, então, transferida para o tubo Powerlyzer Glass Bead Tube (MO-BIO, Carlsbad, Califórnia, EUA). A concentração do produto purificado da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi medida com o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O par de *primers* (Sm479F: 5'-TCGCGAAAAAGATAAACAACA-3'; e Sm479R: 5'-GCCCTTCACAGTTGGTTAG-3')⁽²⁰⁾ foi obtido da Invitrogen (Tóquio, Japão). A PCR em tempo real foi realizada pelo sistema StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Cada tubo de reação continha uma mistura de reação, incluindo 6,5μL de SYBR Green (Roche, Illinois, EUA), 1μL de cada *primer*, 4,5μL de água

ultrapura, e 2μL de DNA extraído das amostras. Foram feitos 45 ciclos de 15 segundos, a temperatura de 94°C para desnaturação; 30 segundos a 56°C, para recozimento; e 30 segundos a 72°C, para extensão, seguidos pela análise da curva de fusão do produto da PCR. Foram feitos dois testes PCR para todas as amostras. Para controle positivo, foi utilizado o DNA de *S. mutans* (UA159).

Análise estatística

As diferenças nas frequências de detecção de *S. mutans* nas amostras foram obtidas por meio do teste do χ^2 . A correlação entre a detecção positiva de *S. mutans* e os dados obtidos em entrevistas foi testada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Streptococcus mutans não foi detectado na maioria das amostras de colostro (84%) e nem de saliva dos recém-nascidos (70%) e mães (51%) (Tabela 1). A análise comparativa entre as frequências da detecção positiva e negativa de *S. mutans* nas amostras mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de colostro e saliva total das mães, ou seja, a saliva materna apresentou maior presença de *S. mutans* do que o colostro (teste do χ^2 ; $p < 0,05$). Foi encontrada correlação positiva entre a detecção positiva e negativa de *S. mutans* entre a saliva dos recém-nascidos e a materna (correlação de Spearman; $p < 0,05$; $rs = 0,36$).

A maioria das participantes (70%) não passou por tratamento dentário durante a gestação (Tabela 2). Mais

Tabela 1. Amostras positivas e negativas de colostro, saliva materna e saliva do recém-nascido para detecção de *Streptococcus mutans*

Amostras n=43	Positiva n (%)	Negativa n (%)
Colostro	7 (16)*	36 (84)*
Saliva materna	21 (49)*	22 (51)*
Saliva do recém-nascido	13 (30)	30 (70)

* Teste do χ^2 ; $p < 0,003$; $q = 10,37$.

Tabela 2. Amostras com detecção positiva e negativa de *Streptococcus mutans* em colostro, saliva materna, saliva do recém-nascido de acordo com os dados de saúde oral

Dados	n (43)	Colostro		Saliva materna		Saliva do recém-nascido	
		Positiva n (%)	Negativa n (%)	Positiva n (%)	Negativa n (%)	Positiva n (%)	Negativa n (%)
Saúde oral							
Consultas frequentes com dentista	16	2 (13)	14 (87)	7 (44)	9 (56)	6 (38)	10 (62)
Não	27	5 (19)*	22 (81)*	14 (52)*	13 (48)*	7 (26)	20 (74)
Tratamento dentário durante a gestação							
Sim	13	3 (23)	10 (77)	4 (31)	9 (69)	5 (38)	8 (62)
Não	30	4 (13) [†]	26 (87) [†]	17 (57) ^{††}	13 (43) ^{††}	8 (27) [†]	22 (73) [†]
Número escovações de dente por dia							
1-2	16	4 (25) [§]	12 (75) [§]	10 (63) [§]	6 (37) [§]	6 (38)	10 (62)
Mais de 3	27	3 (11) [¶]	24 (89) [¶]	11 (41) [¶]	16 (59) [¶]	7 (26)	20 (74)

* teste exato de Fisher, $p < 0,05$; [†] teste exato de Fisher, $p = 0,001$; ^{††} teste do χ^2 , $p < 0,001$, $q = 18,47$; [§] teste exato de Fisher, $p < 0,01$; [¶] teste exato de Fisher, $p < 0,01$.

de 60% informaram que iam regularmente ao dentista e escovavam os dentes mais de três vezes ao dia (Tabela 2). Embora 69% das mães que não passaram por tratamentos dentários durante a gravidez tenham apresentado *S. mutans*, este dado não se mostrou estatisticamente significativo ($p > 0,05$). A ausência de tratamento dentário durante a gestação resultou em maior número de amostras positivas para *S. mutans* na saliva total das mães do que no colostro e na saliva dos recém-nascidos ($p < 0,05$).

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de detecção de *S. mutans* nas amostras, de acordo com o número de vezes que as mães escovam os dentes por dia ($p > 0,05$). Também não houve diferenças estatisticamente significativas entre o colostro e a saliva dos recém-nascidos, nem entre a saliva materna e a saliva dos recém-nascidos ($p > 0,05$). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa na frequência da detecção de *S. mutans* quando comparada entre o colostro e a saliva materna na variável escovação dentária diária para as opções uma a duas vezes e três vezes ($p < 0,01$).

DISCUSSÃO

Analisar a presença de *S. mutans* pela detecção de material genético no colostro e na saliva de mães e recém-nascidos, e comparar os resultados a dados sobre higiene oral e hábitos higiênicos. O par de *primers* Sm479F/R é altamente específico e sensível para a identificação de *S. mutans* em amostras de DNA purificadas ou misturadas.⁽²⁰⁾ Embora a PCR tenha sido eficaz na detecção de *S. mutans* nas amostras e no controle positivo, deve-se considerar que a detecção do material genético com a utilização dos ensaios não diferencia entre microrganismos vivos e não vivos, ou fragmentos bacterianos. Todas as amostras eram de bebês que nasceram de parto cesáreo, e o tipo de nascimento é fator que influencia na composição da microbiota intestinal na primeira infância.⁽²¹⁾

Embora estudos prévios tenham detectado espécies de *Streptococcus* em abundância no colostro,⁽²²⁾ em nosso estudo apenas 16% das amostras de colostro apresentaram presença da *S. mutans*. As vias de entrada das bactérias pelas glândulas mamárias, e de saída pelo colostro e leite maduro ainda não estão claras. Há algumas hipóteses sobre a presença das bactérias nas glândulas mamárias, como o contato com o ambiente externo, a entrada das bactérias por vias dentro do corpo humano e possível associação das duas primeiras hipóteses.⁽²³⁾ A contaminação externa pode ocorrer pelo contato da

microbiota neonatal bucal com a microbiota da pele durante o aleitamento.⁽²⁴⁾ Isso poderia explicar a predominância de *Staphylococcus* e *Streptococcus* no leite materno, ambos comensais típicos da microbiota oral e da pele.^(25,26) Contudo, a coleta do colostro foi feita antes do primeiro contato da mãe com o recém-nascido e após assepsia das mamas. Outra via envolve a rota interna bacteriana, que ocorre quando microrganismos orais alcançam o intestino materno, saem por meio da internalização em leucócitos (como as células dendríticas), migram para os vasos linfáticos através da circulação sanguínea e chegam às glândulas mamárias.^(27,28) Portanto, os recém-nascidos que recebem *S. mutans* da mãe pelo colostro no primeiro dia de vida foram minoria, mas esse processo de translocação bacteriana pode ser mais intenso, quando o estímulo da sucção e a liberação hormonal estimulam maior funcionamento das glândulas mamárias e, conseqüentemente, a secreção de bactérias que devem ser investigadas.

A boca é o local do corpo com a maior diversidade de bactérias, em comparação à microbiota intestinal e vaginal.⁽²⁹⁾ Assim como em outras interfaces do corpo, a mucosa oral está constantemente lutando pela integridade de seu tecido. O sistema imune trabalha para prevenir a invasão de tecidos por bactérias da cavidade oral.⁽³⁰⁾ Porém, durante a gestação, há aumento na permeabilidade gengival devido a mudanças hormonais, o que pode contribuir para a transferência de bactérias da boca para a circulação sanguínea. Alguns estudos confirmam a presença de bactérias da cavidade oral nos tecidos fetais, especialmente aquelas associadas à doença periodontal, como *Fusobacterium nucleatum* em mulheres que tiveram partos prematuros.⁽³¹⁾ Sabe-se pouco das bactérias cariogênicas do nicho oral materno no desenvolvimento do sistema imune e na colonização oral do feto.

Os resultados mostram que, embora o microrganismo esteja presente em algumas amostras de saliva materna, nem sempre entra na circulação, alcança as glândulas mamárias e é secretado com o colostro. Algumas mães apresentaram *S. mutans* na saliva, mas não no colostro. E, ao contrário, a presença de *S. mutans* foi observada em três amostras de colostro de mães cuja saliva não apresentou *S. mutans*. Considerando-se que a *S. mutans* pode ser transitória na cavidade oral, é possível que a bactéria não estivesse presente na cavidade oral na hora da coleta. Em geral, 33% das mulheres infectadas transmitiram a bactéria pelo colostro.

Dos recém-nascidos, 30% apresentavam presença de *S. mutans* na saliva, assim como suas mães. Isso sugere que a exposição à bactéria e a conseqüente colonização podem ocorrer ainda durante a vida intrauterina.

A *S. mutans* é transmitida ao feto pela via enteromamária, chegando à cavidade oral quando o líquido amniótico é engolido. Este mecanismo poderia explicar o estímulo imune e a consequente produção da IgA salivar contra *S. mutans* em recém-nascidos.^(7,8) Esses achados são diferentes de outros que não detectaram as bactérias no nascimento pela técnica *checkerboard*,⁽⁸⁾ mas que utilizaram apenas crianças entre 5 e 11 meses de vida.⁽³⁾

Os dados obtidos nas entrevistas com as mães são importantes com relação à higiene oral e aos hábitos de comportamento e sua associação com a presença de *S. mutans* nas amostras. As mães que disseram não ir ao dentista regularmente e que não passaram por tratamento dentário durante a gestação apresentaram maior frequência de *S. mutans* na saliva. Por outro lado, o colostro e a saliva dos recém-nascidos dessas mesmas participantes apresentava baixa frequência de *S. mutans* detectável. A frequência da detecção de *S. mutans* nas pacientes que disseram escovar os dentes mais do que três vezes por dia mostrou-se mais baixa em todas as amostras. O número de escovações por dia não apresentou diferenças na detecção positiva e negativa de *S. mutans* em cada grupo de amostras. A comparação entre as amostras demonstrou diferenças entre o colostro e a saliva das mães – houve mais amostras de colostro com detecção negativa do que amostras de saliva materna, para as opções de escovação uma a duas vezes ao dia, e mais de três vezes por dia.

CONCLUSÃO

Streptococci mutans pode ser detectado na minoria das amostras de colostro. Dados sobre comportamento e hábitos de higiene parecem influenciar na detecção de *Streptococci mutans* nas amostras maternas de saliva e colostro. Tratamentos dentários e prevenção de cáries durante a gravidez e após o nascimento do bebê devem ser usados para evitar a transmissão de *Streptococci mutans* pela saliva e leite maternos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (2848/2011).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Silva CB: coleta de dados, realização dos experimentos e revisão do manuscrito. Mendes MM: desenho do es-

tudo, realização dos experimentos, coleta e análise de dados e redação do manuscrito. Rodrigues BR: participação na análise e interpretação de dados e revisão do manuscrito. Pereira TL: participou da análise e interpretação dos dados e revisou o manuscrito. Rodrigues DB: participação na análise e interpretação de dados e revisão do manuscrito. Rodrigues Junior V: desenho do estudo e revisão do manuscrito. Ferriani VP: desenho do estudo e revisão do manuscrito. Geraldo-Martins VR: desenho do estudo, supervisão da coleta e análise de dados e revisão do manuscrito. Nogueira RD: desenho do estudo, supervisão da coleta de dados e experimentos laboratoriais, participação na interpretação de dados e revisão do manuscrito.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Silva CB: <http://orcid.org/0000-0002-1034-3790>
 Mendes MM: <http://orcid.org/0000-0001-8800-8215>
 Rodrigues BR: <http://orcid.org/0000-0003-3638-394X>
 Pereira TL: <http://orcid.org/0000-0002-6601-0207>
 Rodrigues DB: <http://orcid.org/0000-0003-0447-6244>
 Rodrigues Junior V: <http://orcid.org/0000-0001-8706-4223>
 Ferriani VP: <http://orcid.org/0000-0002-9555-9389>
 Geraldo-Martins VR: <http://orcid.org/0000-0002-4312-3073>
 Nogueira RD: <http://orcid.org/0000-0002-7706-1376>

REFERÊNCIAS

1. Smith DJ, Taubman MA. Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci. *J Clin Immunol.* 1990; 10(5):273-81.
2. Heilmann A, Tsakos G, Watt RG. Oral Health Over the Life Course. In: Burton-Jeangros C, Cullati S, Sacker A, Blane D, editors. A life course perspective on health trajectories and transitions [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015 [cited 2018 Aug 17]. Chapter 3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385369/>
3. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 4):476-81.
4. Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. *J Can Dent Assoc.* 2003;69(5):304-7.
5. Lynch DJ, Villhauer AL, Warren JJ, Marshall TA, Dawson DV, Blanchette DR, et al. Genotypic characterization of initial acquisition of *Streptococcus mutans* in American Indian children. *J Oral Microbiol.* 2015;7(1):27182.
6. Maki Y, Sakayori T, Hirata S, Ishii T, Tachino A. Monitoring caries risks before the window of infection and later caries increment: a caries prediction study on rapid detection of *Streptococcus mutans* using monoclonal antibodies. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2014;55(1):19-23.
7. Borges MC, Sesso ML, Roberti LR, de Menezes Oliveira MA, Nogueira RD, Geraldo-Martins VR, et al. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. *Arch Oral Biol.* 2015;60(1): 116-25.
8. Nogueira RD, Sesso ML, Borges MC, Mattos-Graner RO, Smith DJ, Ferriani VP. Salivary IgA antibody responses to *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* in preterm and fullterm newborn children. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):647-53.

9. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front Microbiol.* 2016;7:492.
10. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic review of the human milk microbiota. *Nutr Clin Pract.* 2017;32(3):354-64. Review.
11. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(1):219-26.
12. Goldsmith F, O'Sullivan A, Smilowitz JT, Freeman SL. Lactation and intestinal microbiota: how early diet shapes the infant gut. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2015;20(3-4):149-58. Review.
13. Jeurink PV, van Bergenhengouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes.* 2013;4(1):17-30. Review.
14. van Herwijnen MJ, Zonneveld MI, Goerdayal S, Nolte-'t Hoen EN, Garssen J, Stahl B, et al. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(11):3412-23.
15. Victora CG, Bahl R, Barros AJ, França GV, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, Rollins NC; Lancet Breastfeeding Series Group. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet.* 2016;387(10017):475-90. Review.
16. Wong PD, Birken CS, Parkin PC, Venu I, Chen Y, Schroth RJ, Maguire JL; TARGet Kids Collaboration. Total breast-feeding duration and dental caries in healthy urban children. *Acad Pediatr.* 2017;17(3):310-5.
17. Tham R, Bowatte G, Dharmage SC, Tan DJ, Lau MX, Dai X, et al. Breastfeeding and the risk of dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):62-84. Review.
18. Bertoldo BB, Silva CB, Rodrigues DB, Geraldo-Martins VR, Ferriani VP, Nogueira RD. Comparisons of IgA response in saliva and colostrum against oral streptococci species. *Braz Oral Res.* 2017;31:e39.
19. Petrechen LN, Zago FH, Sesso ML, Bertoldo BB, Silva CB, Azevedo KP, et al. Levels and complexity of IgA antibody against oral bacteria in samples of human colostrum. *Immunobiology.* 2015;220(1):142-6.
20. Chen Z, Saxena D, Caulfield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;272(2):154-62.
21. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118(2):511-21.
22. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6(6):e21313.
23. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev.* 2015;73(7):426-37. Review.
24. Ramsay DT, Hartmann PE. Milk removal from the breast. *Breastfeed Rev.* 2005;13(1):5-7.
25. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962-74.
26. Kong HH, Segre JA. Skin microbiome: looking back to move forward. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):933-9. Review.
27. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 2014;16(9):2891-904.
28. Martín-Sosa S, Martín MJ, Castro MD, Cabezas JA, Hueso P. Lactational changes in the fatty acid composition of human milk gangliosides. *Lipids.* 2004;39(2):111-6.
29. Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis.* 2010;16(2):136-45. Review.
30. Kliman HJ. Comment on "the placenta harbors a unique microbiome". *Sci Transl Med.* 2014;6(254):2541e4.
31. Davenport ES, Williams CE, Sterne JA, Murad S, Sivapathasundram V, Curtis MA. Maternal periodontal disease and preterm low birthweight: case-control study. *J Dent Res.* 2002;81(5):313-8.