U.PORTO

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

IMPACT OF MATERNAL OBESITY AND HYPERTENSION ON THE PREVALENCE OF POTENTIAL PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC BACTERIA IN THE ORAL CAVITY OF MOTHER-CHILD PAIRS

MARIANA COIMBRA BRANCO MARTINS FERNANDES

TESE DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO, 2021

U.PORTO

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

IMPACT OF MATERNAL OBESITY AND HYPERTENSION ON THE PREVALENCE OF POTENTIAL PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC BACTERIA IN THE ORAL CAVITY OF MOTHER-CHILD PAIRS

MARIANA COIMBRA BRANCO MARTINS FERNANDES

TESE DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO, 2021

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, para obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária

Autora

Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes

Aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária

up201604535@edu.fmd.up.pt

Orientadora

Joana Araújo Alves de Campos

Investigadora Júnior no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto

joana.campos@i3s.up.pt

Consultora

Maria João Maia Azevedo

Investigadora no Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto

mjazevedo@i3s.up.pt

Porto, 2021

“Either write something worth reading or do something worth writing”

Benjamin Franklin

Acknowlegdments

A presente monografia é fruto de muito esforço e dedicação e gostaria de deixar expresso a minha gratidão a todas as pessoas que me acompanharam durante este percurso e que de certo modo contribuíram para a realização desta monografia.

***Aos meus pais Daniel e Mª Eduarda*,**

Por todo o carinho, paciência e apoio incondicional. Por todos os ensinamentos e por me acompanharem em todas as minha decisões e incentivo para me tornar uma pessoa melhor. Serei eternamente agradecida porque sem vocês não teria chegado aqui.

Ao meu mano Daniel,

Por toda a motivação e apoio durante estes 5 anos. Pela alegria que emanas desde que te conheço e por me ajudares em todos os bons e maus momentos.

À Professora Benedita Sampaio-Maia,

Por me introduzir ao mundo da microbiologia. Por ter acreditado em mim e reconhecer a vontade que tinha em realizar uma investigação. Por não ter desistido de mim e ter proporcionado esta oportunidade de conhecer a área de investigação e conhecer pessoas maravilhosas. Um eterno obrigada.

Às minhas orientadoras Joana e Maria,

Quero vos manifestar um agradecimento especial. Obrigada do fundo do coração por toda a vossa paciência, preocupação e carinho. Agradeço tudo que me ensinaram, pela vossa simpatia, por integrarem no vosso grupo, por toda as dúvidas que vocês me tiraram, sem vocês nada disto seria possível. Agradeço toda a confiança que tiveram em mim, por

estimularem o meu interesse pela vida académica e pelo conhecimento. Agradeço a vossa amizade, não poderia ter tido mais sorte. Espero que esta amizade não fique por aqui e que se mantenha durante o futuro.

À Dr.ª Carla Campos,

Por toda o apoio fulcral e imprescindível durante este trabalho.

À minha restante família,

Por toda a motivação e carinho que me deram durante este meu percurso.

Aos meu amigos,

Por estarem sempre comigo, nos bons e maus momentos. Pela paciência, por me tornarem quem eu sou hoje. Sem vocês nada teria sido igual. Agradeço toda a felicidade que me forneceram. Um eterno obrigada por serem um dos pilares da minha vida. Vos levarei comigo para sempre.

Ao Pedro,

Um agradecimento especial, por todo o amor e carinho durante este percurso. Por toda a motivação e sempre acreditares que eu iria conseguir alcançar os meus objetivos.

A todos, um eterno obrigada

Resumo

Introdução: A disbiose oral desempenha um papel fundamental nas infeções orais comuns, que podem causar ou agravar doenças sistémicas, destacando a relevância de microrganismos patogénicos ou oportunistas orais. No início da vida, a mãe representa a fonte mais importante de microrganismos e vários fatores maternos influenciam a aquisição e maturação do microbioma oral da criança. Contudo, o impacto do microbioma da mãe no ecossistema oral das crianças permanece ainda pouco explorado.

Objetivo: O principal objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da obesidade materna e hipertensão na prevalência de potenciais bactérias patogénicas e oportunistas na cavidade oral de pares mãe-filho. Além disso, pretendemos correlacionar o perfil da microbiota oral com a saúde oral materna, tabagismo e hábitos alcoólicos, saúde cardiovascular e os desfechos obstétricos e perinatais.

Metodologia: Um total de 30 pares mãe-filho foram incluídos neste estudo e 82 amostras foram colhidas 4 a 12 semanas após o parto, nomeadamente, saliva não estimulada e leite das mães e esfregaços orais dos respetivos filhos. Cada amostra foi inoculada em meios seletivos e diferenciais (*MacConkey*, *Mannitol Salt* e *Mitis Salivarius agar*) incubados a 37ºC/24-48h. Foram selecionadas colónias com diferentes morfologias e isoladas em *Brain Heart Infusion agar* (37ºC/18-20h) para identificação por MALDI-TOF MS.

Resultados: Entre os 285 isolados identificados, *Stenotrophomonas maltophilia* (15.9%) e *Serratia marcescens* (13.6%) foram as espécies bacterianas gram-negativas mais prevalentes (15.4%), principalmente na saliva materna e no esfregaço infantil, respetivamente. Relativamente às bactérias gram-positivas (84.6%), as espécies mais prevalentes foram *Staphylococcus epidermidis* (42.3%) e *Staphylococcus aureus* (17.4%) nas amostras da mãe e *Staphylococcus hominis* (12.9%) nas amostras das crianças. Em 86.7% dos pares mãe-filho foi identificada a mesma espécie bacteriana, sugerindo uma possível transmissão de microrganismos da saliva ou leite materno para o microbioma oral da criança. De facto, um aumento na diversidade foi verificado em todos os três tipos de amostras (saliva da mãe, leite e esfregaço oral da criança) no grupo de estudo saudável comparativamente com os grupos de risco cardiovascular estudados (obesidade e hipertensão arterial). Adicionalmente, foi observada uma correlação entre a diversidade de

microrganismos da mãe e da criança. Após a análise dos comportamentos de saúde oral materna, observou-se que a presença de *S. aureus* nesses pares foi associada a uma menor frequência de escovagem dentária materna (P=0.05). Além disso, verificou-se uma correlação negativa entre a presença de *S. epidermidis* nas amostras de saliva materna e o maior número de consultas dentárias maternas no ano anterior (P<0.01). Curiosamente, a presença de *S. epidermidis* em amostras de esfregaços orais das crianças foi associada ao hábito materno de lamber a chupeta como meio de higiene (P=0.032).

Conclusão: O risco cardiovascular da mãe (obesidade e hipertensão arterial) parece influenciar a aquisição de microrganismos orais pela criança ao diminuir a sua diversidade. Para além disso, este estudo sugere a transmissão vertical como uma potencial via para a aquisição oral de bactérias oportunistas e patogénicas no início da vida, via contato oral materno e amamentação, destacando também a importância dos hábitos de saúde oral e comportamentos maternos no microbioma oral.

Palavras-Chave: Microbioma oral; Saúde oral materna; Comportamento oral materno; Transmissão mãe-filho do microbioma; Bactérias oportunistas/patogénicas.

Abstract

Introduction: Oral dysbiosis plays a key role in common oral infections, which can cause or aggravate systemic diseases, highlighting the relevance of oral pathogenic or opportunistic microorganisms. In early life, the mother represents the most important source of microorganisms and several maternal factors highly influence the child´s oral microbiome acquisition and maturation. However, the impact of the maternal microbiome on the oral ecosystem of the child remains underexplored.

Objective: The main objective of this study was to evaluate the impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs. Furthermore, we intended to correlate the oral microbiota profile with maternal oral health, smoking and alcoholic habits, cardiovascular health, and the obstetric and perinatal outcomes.

Methodology: A total of 30 Mother-Child pairs were included in this study and 82 samples were collected 4 to 12 weeks after delivery, namely unstimulated saliva and breastmilk from the mothers and oral swabs from their children. Each sample was inoculated in selective and differential media (MacConkey, Mannitol Salt and Mitis Salivarius agar) and incubated at 37ºC/24-48h. Colonies presenting different morphologies were selected and isolated in Brain Infusion agar (37ºC/18-20h) for identification by MALDI-TOF MS.

Results: Amongst the 285 isolates identified, *Stenotrophomonas maltophilia* (15.9%) and *Serratia marcescens* (13.6%) were the most prevalent gram-negative bacteria (15.4%), mainly in mother saliva and child oral swab, respectively. Regarding gram-positive bacteria (84.6%), the most prevalent were *Staphylococcus epidermidis* (42.3%) and *Staphylococcus aureus* (17.8%) in mother samples and *Staphylococcus hominis* (12.9%) in child swab samples. Furthermore, 86.7% of the mother-child pairs shared the same species, suggesting a possible bacterial transmission from maternal saliva or milk to the child oral microbiome. In fact, a higher diversity of microorganisms was observed in all three type of samples (mother saliva, breastmilk and child oral swab) of healthy study group, contrasting with the cardiovascular risk groups studied (obesity and arterial hypertension), which were associated with a lower diversity. Additionally, a correlation was observed between the mother and child microorganism diversity. Also, after analyzing maternal oral health behaviours, it was observed that the presence of *S. aureus* in these pairs was associated with a lower frequency

of maternal toothbrushing (*P*=0.05). Also, a negative correlation was established between *S. epidermidis* presence in mother saliva samples and a higher number of maternal dental appointments in the previous year (*P*<0.01). Interestingly, *S. epidermidis* presence in child oral swab samples was associated with the maternal habit of licking their children pacifier as a mean of hygiene (*P*=0.032).

Conclusion: The mother's cardiovascular risk (obesity and arterial hypertension) seems to influence the child's oral microbiota acquisition by diminishing its diversity. Moreover, this study suggests vertical transmission as a potential pathway for oral opportunistic and pathogenic bacteria acquisition in early life via maternal oral contact and breastfeeding routes and highlights the importance maternal oral health habits and related behaviours have on the oral microbiome.

Keywords: Oral microbiome; Maternal oral health; Maternal oral behaviour; Mother-Child microbiome transmission; Opportunistic/pathogenic bacteria.

Table of Contents

Acknowledgments ix

Resumo xi

Abstract xiii

List of Figures xvii

List of Tables xix

List of Abbreviations xxi

1. Introduction 3

2. Methodology 9

2.1. Patient recruitment 9

2.2. Sample and data collection 9

2.3. Sample processing 11

2.4. Microorganism isolation 11

2.5. Isolate identification 13

2.6. Statistical Analysis 15

3. Results 19

3.1. Demographic and clinical information 19

3.2. Microbiological characterization 22

3.2.1. Microorganism prevalence 22

3.2.2. Microorganism diversity 26

3.2.3. Correlation between the presence of microorganisms and maternal factors 27

4. Discussion 33

5. Conclusion ……..…… 43

6. Bibliography ……..…… 47

7. Attachments ……..…… 57

7.1. Ethics Committee Statement …… 57

7.2. University of Porto Statement ……..…… 58

7.3. Compliance of the University of Porto Directives Statement ……..…… 61

7.4. Author's Statement ……... 62

7.5. Advisor's Statement ……... 63

7.6. Model of Work Disclosure Statement …… 64

7.7. Participation in Scientific Meetings ……. 65

7.7.1. National Oral Communications ……..……..……. 65

7.7.2. National Poster Communications ……... 65

7.7.3. International Poster Communication …..…….. 66

7.8. Authorization of the Responsible for Access to the Information (Nº294/2018) 67

7.9. Authorization of the Responsible for Access to the Information (86/CE/JAS) …. 74

7.10. Participant Information Sheet …… 75

7.11. Informed Consent …… 76

7.12. Mother Questionnaire ……... 77

7.13. Child Questionnaire …… 83

List of Figures

Figure 1: Perinatal factors´ impact on the development of the mother and child´s gut microbiome during foetal growth. Adapted from Wang et al. (2020).[14] 4
Figure 2: Protocol for samples processing until microorganism's isolation and preservation. 10
Figure 3: Gram-negative bacteria in MacConkey agar plates after incubation at 37°C for 24h. 11
Figure 4: Gram-positive bacteria in Mannitol-Salt agar plates after incubation at 37°C for 48h. 12
Figure 5: Mitis Salivarius agar plates after incubation at 37°C for 48h. 12
Figure 6: Protocol for isolates identification by MALDI-TOF MS system. 14
Figure 7: Simultaneous presence (%) of microorganism's species *per* study group. 25
Figure 8: Heat map demonstrating the microorganism diversity *per* sample type for each study group 27

List of Tables

Table I: Demographic information of the recruited healthy, obese, and hypertensive pregnant women. 19
Table II: Clinical and lifestyle information of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women. 20
Table III: Clinical and nutritional information of the children of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women. 21
Table IV: Factors promoting microorganism transmission of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women, and their children. 21
Table V: Oral health parameters of healthy, obese and hypertensive pregnant women. 22
Table VI: Microorganism prevalence (%) *per* study group and type of samples for all identified isolates..... 24
Table VII: Simultaneously presence of the microorganisms in mother and child samples. ... 26
Table VIII: Correlation between microorganisms in mother-child pair samples. 28
Table IX: Correlation between mother saliva microorganisms and maternal factors. 28
Table X: Correlation between mother breastmilk microorganisms and maternal factors. 28
Table XI: Correlation between child swab microorganisms and maternal factors..... 29
Table XII: Correlation between microorganism diversity and maternal factors. 29

List of Abbreviations

AP-PCR	Arbitrarily primed polymerase chain reaction
BHI	Brain Heart Infusion
BMI	Body mass index
BOP	Bleeding on probing
CAL	Clinical attachment loss
CHUSJ	Centro Hospitalar Universitário de São João
C-section	Caesarean section
DMFS	Decayed, missing and filled surfaces
DNA	Deoxyribonucleic acid
FMDUP	Faculty of Dental Medicine of the University of Porto
IAP	Intrapartum Antibiotic Prophylaxis
i3S	Institute for Research and Innovation in Health
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry
PI	Plaque index
ULSM	Unidade Local de Saúde de Matosinhos
WGS	Whole Genome Sequencing

INTRODUCTION

1. Introduction

The human microbiome is defined as a set of diverse microorganisms that inhabit a specific location of the human body, as the skin, the gut, and the oral cavity, which play a key role in the balance between health and disease.[1] The host-microbiome dyad regulates paramount aspects for a normal physiology, metabolism, immunity, and neurologic function of the host.[2] In contrast, dysbiosis represents an unbalance in the microbial community caused by a decrease or increase in the bacterial function and diversity or even a sudden fluctuation in the profusion of microorganisms.[3] This ecological change seems to have a preponderant contribution to the etiopathogenesis of several systemic pathologies, such as celiac disease and Alzheimer's.[2-4]

The oral cavity houses the second largest microbiome diversity in the human body, possessing more than 700 species, mostly indigenous.[5, 6] The oral microbiome encompasses a community of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms including bacteria, archaea, protozoa, and viruses housed in different habitats of the oral cavity, such as the teeth, gum, cheeks and tongue.[6] Furthermore, numerous studies have been demonstrating over the years that oral dysbiosis plays a crucial role in the pathogenesis and development of the most common oral infectious diseases (dental caries, periodontal disease and candidiasis) due to the presence pathogenic or opportunistic microorganisms (e.g., *Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Candida* sp.).[7-10] In addition to the inherent risk of spread to the various organs and tissues, these microorganisms can cause or aggravate systemic diseases, such as diabetes, obesity, cardiovascular disease and even increase the risk of infection.[6, 11]

Until recently, the medical community presumed that, under normal conditions, the fetal intrauterine development occurred in an aseptic environment.[12] Nonetheless, there is clinical evidence demonstrating the presence of bacterial DNA in the amniotic fluid, placenta, and umbilical cord blood in full-term pregnancies.[4, 13] Regardless the debate of whether bacteria are present in the placenta, it is currently recognized that the transmission of a wide variety of microorganisms to the newborn occurs at delivery. However, only a certain number of bacteria can colonize the newborn child.[12] Furthermore, regarding the colonization of the oral cavity, studies focused on the phenotypic and genotypic characteristics of oral microorganisms have been demonstrating that the oral microbiota of the mother represents the most important source of transmission of the oral microbiota of the child in early life.[4]

Additionally, the mothers clinical factors and behaviours, as the antibiotic use, smoking and alcohol consumption and comorbidities, can alter the gut microbiome, which can be transmitted to the infant (**Figure 1**).[14] Consequently, this exposure during pregnancy has been linked to an increased risk to develop several diseases (e.g., obesity, asthma and inflammatory bowel diseases) in both mother and child.[15] Moreover, other maternal factors, such as the type of delivery and feeding, have a high impact on the initial microbiota in infants as they directly influence the acquisition and colonization of the microbiome harbored in multiple human sites (gut, oral cavity and skin).[14] Thus, altering the composition and diversity of the maternal microbiota that is transmitted to the infant may disrupt the vertical mother-child microorganism transmission, therefore prompting the children to colonization by deviant microbiota, such as opportunistic or pathogenic bacteria (**Figure 1**). [16-18]

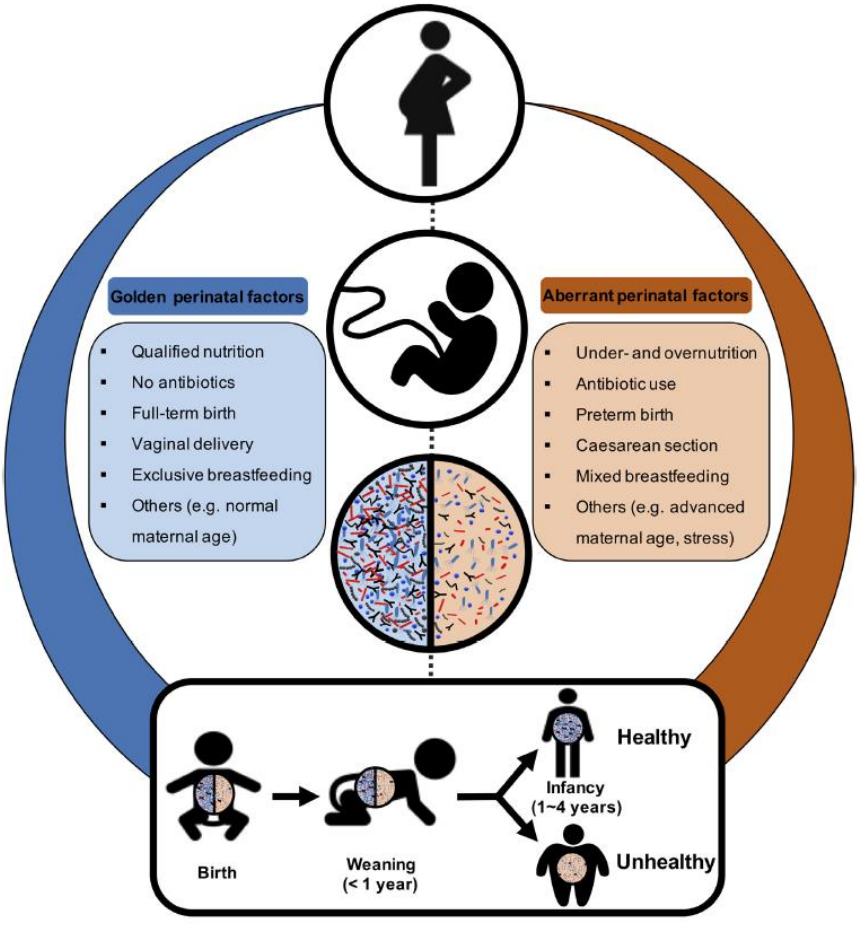


Figure 1: Perinatal factors´ impact on the development of the mother and child´s gut microbiome during foetal growth. Adapted from Wang et al. (2020).[14]

Nevertheless, reports on the impact of maternal oral health behaviours and infant care habits, such as licking the child´s pacifier and kissing the child´s mouth, on the infant´s microbiome are scarce. Also, the influence of mothers oral microbiota with systemic pathologies on the development of the child ecosystem remains underexplored.[6] Thereby, this study aims to identify potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs and correlate the bacterial profiles detected in the samples with maternal cardiovascular risk factors, and other external factors that may potentially affect their colonization.

METHODOLOGY

2. Methodology

2.1. Patient recruitment

The participants were recruited within project “OralBioBorn”, approved by the *Centro Hospitalar Universitário de São João* (CHUSJ) Ethics Committee for Health (Nº294/2018) and *Unidade Local de Saúde de Matosinhos* (ULSM) Ethics Committee for Health (86/CE/JAS). Women recruitment was done at the Obstetrics Service of CHUSJ and ULSM. Exclusion criteria were age under 18 years old, pre-existing cardiomyopathy, kidney disease, chronic obstructive pulmonary disease, active systemic infection, and genetic syndromes. The study groups comprised:

1) Healthy mothers (n=17, without cardiovascular risk factors) and their children.
2) Mothers with arterial hypertension (n=7) and their children.
3) Mothers with obesity (n=6) and their children.

All the participants were informed about the aim of the research, being requested a written consent and, in the case of babies, to their mothers prior to the study enrolment. This study occurred from January 2021 until May 2021 at the Faculty of Dental Medicine of the University of Porto (FMDUP) and the Institute for Research and Innovation in Health (i3S). The protocols for this study were approved by the Ethics Committee for Health of FMDUP.

2.2. Sample and data collection

The mother-child pairs (n=30) underwent saliva and breastmilk collection 4 to 12 weeks after delivery. Maternal unstimulated saliva samples were collected at least 1 hour after a meal or mouth/tooth brushing, into a sterile tube. The oral samples from babies were collected using 4 oral swabs (flocked swabs). The breastmilk was collected either with an electric pump or

manually into a sterile collection tube, after discarding the first drops. All samples (n=82) were collected between June 2019 and February 2021. The characterization of the mother-child pairs was performed through questionnaires which included questions related to maternal oral health, demographic data, smoking and alcoholic habits, clinical data, obstetric and perinatal outcomes, vaccination, and habits that could promote vertical transmission of microorganisms. The collected samples were aliquoted (500 µL of maternal saliva and milk, and a child oral swab) and preserved at -80ºC with 500 µL of Brain Heart Infusion (BHI) broth with 10% glycerol until processing (**Figure 2**).

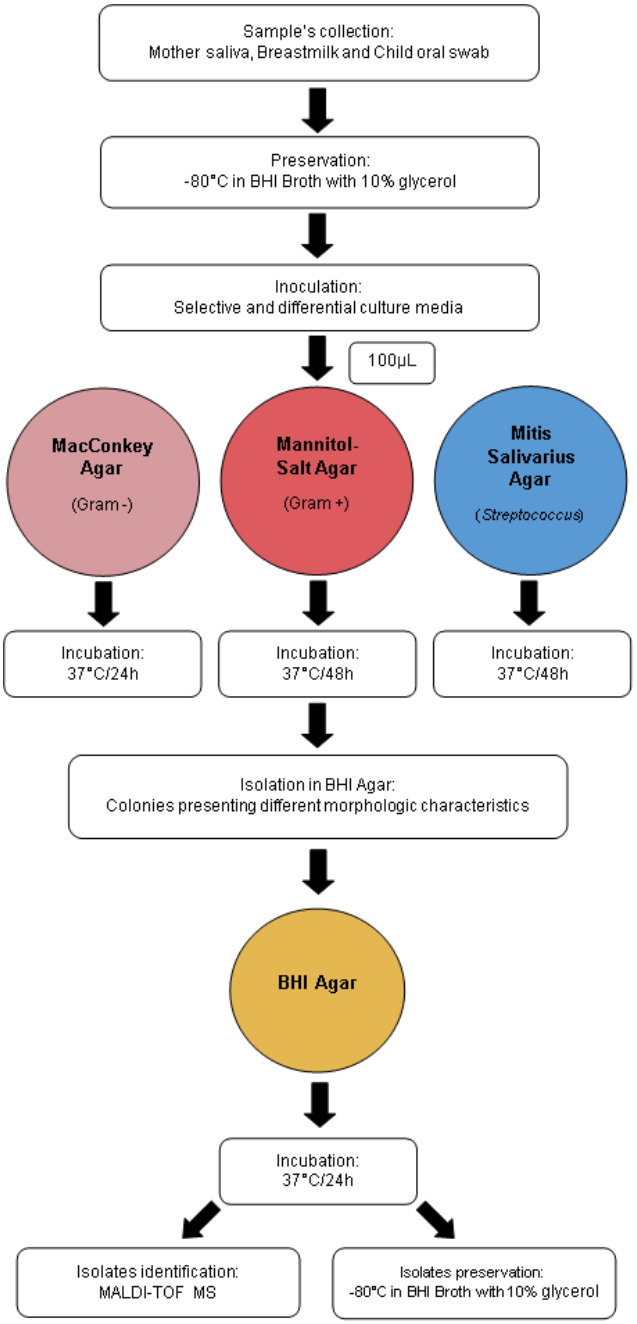


Figure 2: Protocol for samples processing until microorganism's isolation and preservation.

2.3. Sample processing

From each pair, 100 µL of the frozen BHI broth with 10% glycerol with mother saliva, breastmilk and child oral swabs were inoculated in selective and differential culture media, namely, MacConkey agar (Liofilchem®, Italy), Mannitol-Salt agar (Liofilchem®, Italy) and Mitis Salivarius agar (Millipore®, USA), used for the detection of gram-negative, gram-positive bacteria and *Streptococcus* sp., respectively. Then, the plates were incubated at 37°C in aerobic conditions from 24 to 48 hours (**Figure 2**).

2.4. Microorganism isolation

From each sample, all colonies presenting different morphologies such as color, shape, and aspect, were selected (up to 6 isolates *per* plate) and further reisolated in specific media as MacConkey (**Figure 3**), Mannitol-Salt (**Figure 4**) and Mitis Salivarius agar (**Figure 5**).

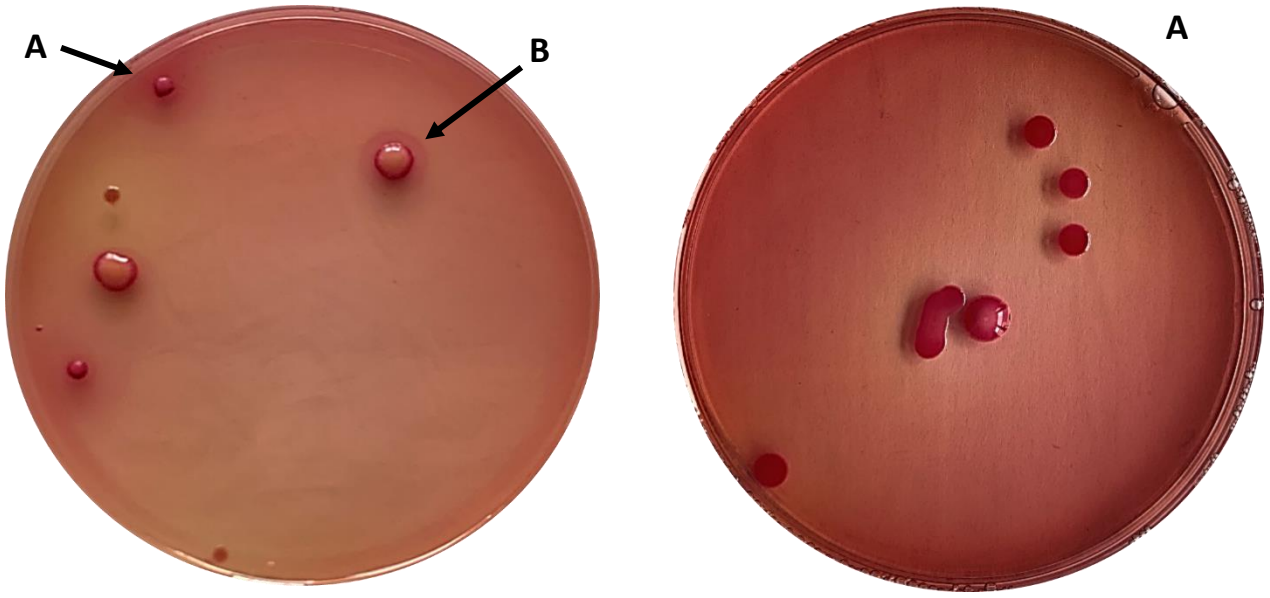


Figure 3: Gram-negative bacteria in MacConkey agar plates after incubation at 37°C for 24h.
Legend: Lactose fermentation: A- Positive (pink); B- Negative (colourless).



Figure 4: Gram-positive bacteria in Mannitol-Salt agar plates after incubation at 37°C for 48h;
Legend: Mannitol fermentation: A- Positive (yellow); B- negative (pink).

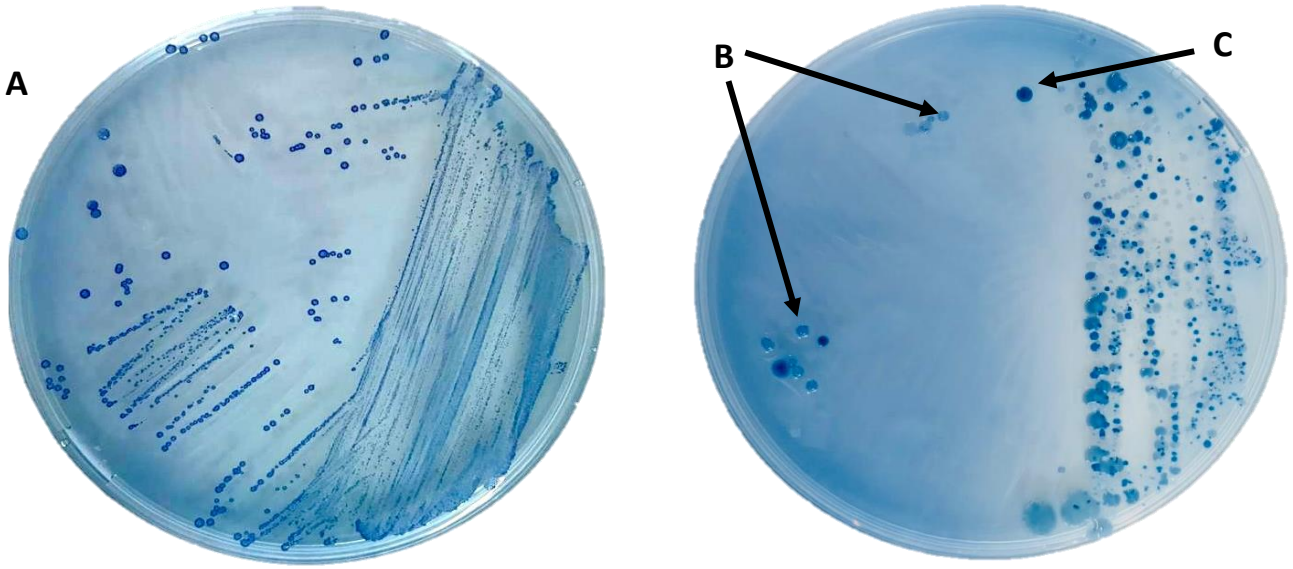


Figure 5: Mitis Salivarius agar plates after incubation at 37°C for 48h.
Legend: A- *Streptococcus vestibularis* (dark-blue, glossy and raised); B- *Streptococcus salivarius* (light blue "gum drop" shape); C- *Enterococcus faecalis* (blue-black).

2.5. Isolate identification

All selected isolates were sub-cultured in BHI agar (Liofilchem®, Italy) plates and incubated at 37ºC, to obtain fresh colonies (24 hours). Each isolate was identified by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). This analysis was conducted directly from the bacterial colonies by inoculation of a single colony on a 96 polished steel MALDI-TOF target plate and subsequently adding 1 µL of the organic matrix (Bruker, Germany). After drying, the plate was positioned in the equipment and the target was processed on the Bruker MALDI Biotyper® system according to manufacturer's instructions. The Biotyper® software identifies microorganisms by matching the pattern created by each isolate against the spectra of the species present in the database. The results of the identification process were expressed as score values ranging from 0 to 3, where values equal or higher than 2.0 were indicative of identification to the species level and values between 1.7 and 2.0 were indicative of identification to the genus level (**Figure 6**).

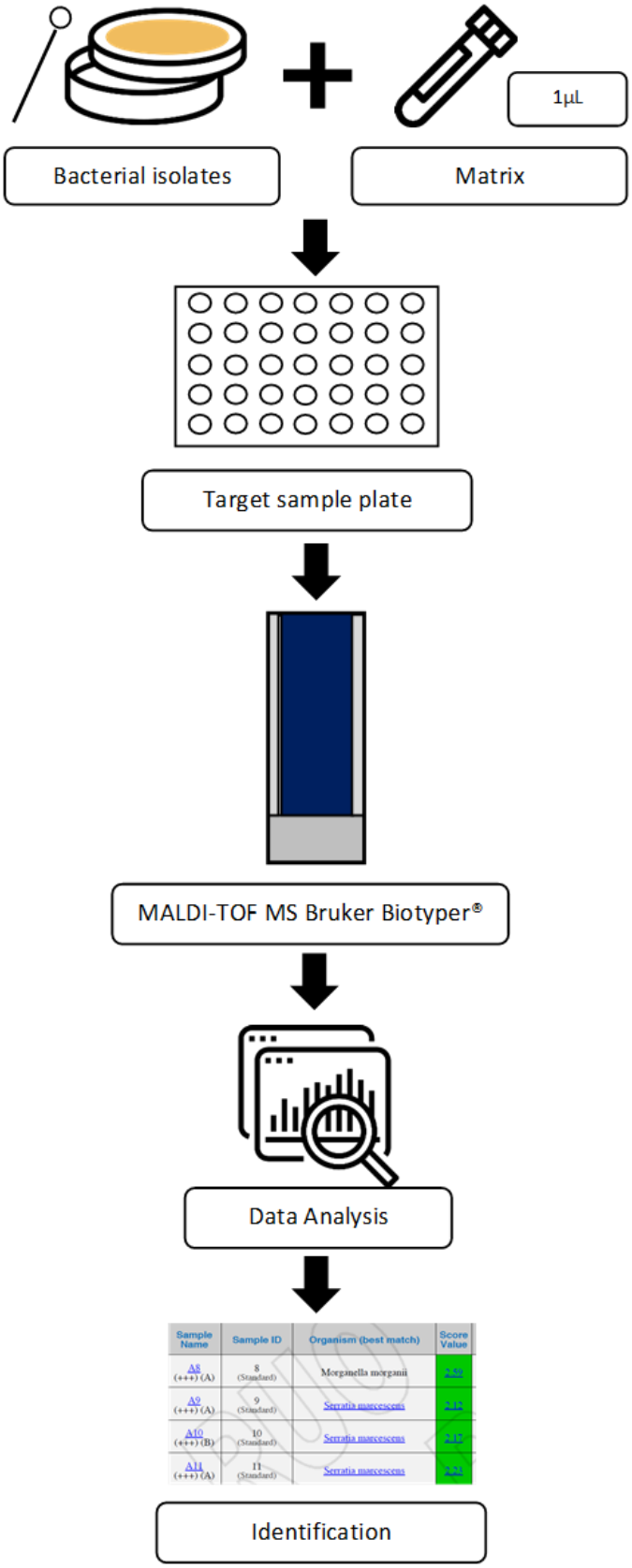


Figure 6: Protocol for isolates identification by MALDI-TOF MS system.

2.6. Statistical Analysis

To perform the data analysis, the software utilized to register the collected data was the Microsoft® Excel® (Microsoft Office 365 ProPlus, 2002 version) and for the statistical analysis the Statistical Package for the Social Science (IBM® SPSS® Statistics, SPSS Inc, Chicago, IL, USA, 26 version).

The different categorical variables were dichotomised, and an analysis was carried out to compare the microorganism prevalence in the different samples: mother saliva, breastmilk and child oral saliva swab in the studied population (0 – not colonized; 1 – colonized).

The results of this research were recorded and submitted to statistical analysis. To interpret the collected data, descriptive analysis was performed in which categorical variables were described by using relative frequencies (%) and compared using the Chi-Square test and Point-Biserial correlation. For the non-categorical variable, non-parametrical tests (Kruskal-Wallis and Mann–Whitney U test) and Spearman correlation were applied. The statistical significance for each test was 5%.

RESULTS

3. Results

3.1 Demographic and clinical information

The population studied included a total of 30 mother-child pairs. The demographic information of the mother, including age, educational level and healthcare related job are displayed *per* study group in **Table I**.

Table I: Demographic information of the recruited healthy, obese, and hypertensive pregnant women.

Demographic information	Healthy	Obesity	Arterial hypertension	*P* value
Number, n (%)	17 (56.7%)	6 (20.0%)	7 (23.3%)	
Age (years)	33.8±0.7	35.0±1.2	35.0±2.6	0.356[a]
Education level (%)				0.157[b]
Basic education	5.9%	0%	0%	
Secondary education	17.6%	83.3%	75.0%	
1st Cycle of studies	47.1%	16.7%	0%	
2nd Cycle of studies	17.6%	0%	25.0%	
3rd Cycle of studies	11.8%	0%	0%	
Healthcare related job	41.2%	33.3%	14.3%	0.446[b]

Results are shown in prevalence (%) or mean±SD;
Statistical analyses were performed using [a]Kruskal-Wallis test and [b]Chi-square test.

Regarding the clinical and lifestyle parameters, such as positive preeclampsia screening, gestational hypertension, body mass index (BMI), comorbidities, antibiotic use, dietary restrictions and alcohol and smoking habits are observed also *per* study group in **Table II.**

Table II: Clinical and lifestyle information of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women.

Clinical and lifestyle information	Healthy	Obesity	Arterial hypertension	*P* value
Positive preeclampsia screening	0%	0%	33.3%	**0.023[a]**
Gestational hypertension	0%	0%	33.3%	**0.023[a]**
Body mass index (BMI) before pregnancy	22.8±0.7	33.3±2.2	25.9±1.4	**0.003[b]**
Comorbidities	64.7%	50.0%	100%	0.167[a]
Rhinitis	27.3%	100%	40.0%	
Vision disturbance	36.4%	100%	20.0%	
Depression	9.1%	50.0%	20.0%	
Anxiety disorder	18.2%	0%	0%	
Asthma	27.3%	0%	40.0%	
Heart disease	9.1%	0%	20.0%	
Migraine	27.3%	0%	0%	
Other	36.4%	0%	40.0%	
Antibiotic use				
During pregnancy	5.9%	16.7%	14.3%	0.684[a]
Intrapartum	52.9%	16.7%	85.7%	**0.045[a]**
Postpartum	18.8%	0%	0%	0.257[a]
Dietary restrictions	35.3%	25.0%	16.7%	0.675[a]
Toxoplasmosis*	75.0%	100.0%	33.3%	0.170[a]
Gestational diabetes	0%	0%	16.7%	0.162[a]
Other	25.0%	0%	50.0%	0.196[a]
Alcohol ingestion during pregnancy	0%	0%	0%	
Alcohol ingestion postpartum (%)	6.7%	25.0%	50.0%	0.115[a]
Smoking habit during pregnancy	8.3±1.7	-	-	0.293[b]
Smoking habit postpartum (cigarettes/day)	9.0±2.9	-	-	0.183[b]

Results are shown in prevalence (%) or mean±SD;
-: No results found; *****: To prevent acquiring infection in non-immune pregnant women;
Statistical analyses were performed using [a]Chi-square test and [b]Kruskal-Wallis test.

The clinical and nutritional information of the children such as medication, type of delivery and feeding mode are shown *per* study group on **Table III**.

Table III: Clinical and nutritional information of the children of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women.

Children clinical and nutritional information	Healthy	Obesity	Arterial hypertension	*P* value[a]
Child therapy	100%	100%	83.3%	0.137
Antibiotic	23.5%	16.7%	0%	0.372
Probiotic	35.3%	33.3%	14.3%	0.582
Type of delivery				
Vaginal	43.8%	100%	40%	0.110
Caesarean	56.3%	0%	60%	0.110
Feeding mode (1st month after delivery)				
Breastfeeding	56.8%	33.3%	57.1%	0.100
Formula	5.9%	16.7%	0%	0.100
Breastfeeding and Formula	35.3%	16.7%	42.9%	0.100

Results are shown in prevalence (%). [a]Statistical analyses were performed using Chi-square test.

Also, the different mother and child factors that promote a microorganism transmission are demonstrated in **Table IV**.

Table IV: Factors promoting microorganism transmission of the recruited healthy, obese and hypertensive pregnant women, and their children.

Factors promoting microorganism transmission	Healthy	Obesity	Arterial hypertension	*P* value[a]
Suctional habits	93.8%	66.7%	100%	0.105
Types of suctional habits				
Fingers	6.7%	0%	14.3%	0.714
Pacifier	26.7%	50.0%	28.6%	0.714
Finger and pacifier	33.3%	50.0%	28.6%	0.714
Pacifier and hand	13.3%	0%	0%	0.714
Finger and hand	13.3%	0%	0%	0.714
All	6.7%	0%	28.6%	0.714
Parental pacifier licking	18.8%	0%	16.7%	0.582
Parental kisses on child´s mouth	6.3%	0%	0%	0.657

Results are shown in prevalence (%). [a]Statistical analyses were performed using Chi-square test.

Finally, the oral health parameters are observed in **Table V**. Regarding the evaluation of the oral health status, it was only conducted on a subgroup of the population studied during the third trimester of pregnancy (n=9 mothers), due to measures implemented during the outbreak of COVID-19. Several parameters were examined such as: Decayed, Missing and Filled Surfaces (DMFS), Clinical Attachment Loss (CAL) larger than 3 (CAL>3), Bleeding on Probing (BOP) and Plaque Index (PI).

Table V: Oral health parameters of healthy, obese and hypertensive pregnant women.

Oral related parameters	Healthy	Obesity	Arterial hypertension	*P* value
Oral health habits				
Dental appointments (n/last year)	2.1±0.7	0.8±0.3	3.1±0.8	**0.036[a]**
Frequency of toothbrushing (n/day)	2.0±0.1	2.0±0.4	2.1±0.1	0.846[a]
Use of toothbrush complements*	94.1%	50.0%	71.4%	0.055[b]
Oral health parameters (n=9)				
DMFS	15.3±6.4	-	20.0±3.3	0.308[a]
CAL>3	5.5±3.3	-	8.5±1.8	0.360[a]
BOP	14.1±6.3	-	31.0±6.8	0.229[a]
PI	61.3±8.5	-	91.4±4.1	**0.047[a]**

Results are shown in prevalence (%) or mean±SD; DMFS: Decayed, Missing and Filled Surfaces; CAL: Clinical Attachment Loss; BOP: Bleeding On Probing; PI: Plaque Index. **-**: No results found;
Statistical analyses were performed using [a]Kruskal-Wallis test and [b]Chi-square test;
*The different complementary means of hygiene are dental floss, interdental brushes and mouthwash.

3.2 Microbiological characterization

3.2.1 Microorganism prevalence

From the 30 mother-child pairs studied, 285 isolates were recovered and a total of 33 bacterial species were identified. Their prevalence is presented *per* type of samples and study group in **Table VI.**

Overall, it was verified that the most prevalent gram-positive bacterium was *Staphylococcus epidermidis* in all types of samples (36.4%-mother saliva, 39.6%-breastmilk, and 21.7%-child oral swab). However, when analyzing particular subgroups, it was observed that *Staphylococcus hominis* was the most prevalent in children' oral swab

samples from healthy and obese mothers (23.8% and 30.0%, respectively). It was also verified that *Staphylococcus aureus* was the second most prevalent in mothers' saliva (16.7%). In breastmilk samples, *S. aureus* and *S. hominis* were both the second most prevalent bacteria (12.5%). Interestingly, *S. aureus* was only detected in breastmilk samples of healthy mothers (18.2%), contrasting with *S. hominis* which was mostly detected in hypertensive mothers (25.0%).

Moreover, the presence of *Staphylococcus saprophyticus* was mostly detected in samples from the healthy group and there was a statistically significant difference when compared its prevalence in mothers' saliva among study groups (P=0.03). Also, *Staphylococcus equorum* was detected in all types of samples from the hypertensive study group. Lastly, an association was observed between *Staphylococcus succinus* in child oral swab samples from mothers with arterial hypertension (P=0.03).

Regarding gram-negative bacteria, *Stenotrophomonas maltophilia* was the most prevalent in healthy mothers' saliva samples (9.5%), which was also observed in children' oral samples (2.4%). *Serratia marcescens* was only detected in breastmilk (14.3%) and children' oral swab samples (10.0%) from obese mothers (**Table VI**). Additionally, it is noteworthy to highlight the presence of several bacteria acknowledged as potential opportunistic/pathogenic, as *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella oxytoca, Citrobacter freundii, Citrobacter braaki* and *Acinetobacter pitti*, in the same mother-child pair, and interestingly the mother has a healthcare-related job.

Table VI: Microorganism prevalence (%) *per* study group and type of samples for all identified isolates.

Division	Family / Species	Mother saliva					Mother breastmilk					Child oral swab				
		H	O	HTN	*P* value[a]	TOTAL	H	O	HTN	*P* value[a]	TOTAL	H	O	HTN	*P* value[a]	TOTAL
Actinobacteria	***Brevibacteriaceae***															
	Brevibacterium casei	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Corynebacteriaceae															
	Corynebacterium propinquum	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Micrococcaceae															
	Kocuria kristinae	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0		-	-	-	0
Firmicutes	***Bacillaceae***															
	Bacillus altitudinis	-	-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	-	-	-	-	0
	Bacillus amyloliquefaciens	-	-	-	-	0	-	14.3	-	0.126	2.1	-	-	-	-	0
	Enterococcaceae															
	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	2.4	-	-	0.673	1.4
	Staphylococcaceae															
	Staphylococcus aureus	14.3	18.2	23.1	0.924	16.7	18.2	-	-	0.057	12.5	19.0	10.0	11.8	0.364	15.9
	Staphylococcus argentus	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Staphylococcus epidermidis	31.0	54.5	38.5	0.376	36.4	36.4	42.9	50.0	0.619	39.6	19.0	20.0	29.4	0.366	21.7
	Staphylococcus equorum	-	-	7.7	0.183	1.5	-	-	12.5	0.183	2.1	-	-	5.9	0.183	1.4
	Staphylococcus haemolyticus	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	12.5	0.183	2.1	-	10.0	-	0.126	1.4
	Staphylococcus hominis	-	9.1	7.7	0.243	3.0	9.1	14.3	25.0	0.810	12.5	23.8	30.0	5.9	0.136	20.3
	Staphylococcus lugdunensis	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	10.0	17.6	0.087	7.2
	Staphylococcus saprophyticus	16.7	-	-	**0.030**	10.6	12.1	14.3	-	0.372	10.4	11.9	-	-	0.101	7.2
	Staphylococcus succinus	-	-	7.7	0.183	1.5	-	-	-	-	0	-	-	11.8	**0.030**	2.9
	Staphylococcus warneri	4.8	9.1	7.7	0.952	6.1	-	-	-	-	0	7.1	-	-	0.280	4.3
	Macrococcus caseolyticus	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
Proteobacteria	***Comamonadaceae***															
	Delftia acidovorans	2.4	-	-	0.673	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Enterobacteriaceae															
	Citrobacter braaki	-	-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	2.4	-	-	0.673	1.4
	Citrobacter freundii	-	-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	2.4	-	-	0.673	1.4
	Enterobacter asburiae	-	-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	2.4	-	5.9	0.577	2.9
	Enterobacter bugandensis	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	10.0	-	0.126	1.4
	Escherichia coli	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	2.4	-	-	0.673	1.4
	Klebsiella oxytoca	2.4	-	-	0.673	1.5	3.0	-	-	0.673	2.1	2.4	-	-	0.673	1.4
	Klebsiella pneumoniae	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	5.9	0.183	1.4
	Morganella morganii	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	5.9	0.183	1.4
	Pantoea agglomerans	2.4	-	7.7	0.577	3.0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Serratia liquefaciens	-	9.1	-	0.126	1.5	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0
	Serratia marcescens	-	-	-	-	0	-	14.3	-	-	2.1	-	10.0	-	-	1.4
	Moraxellaceae															
	Acinetobacter pitti		-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	-	-	-	-	0
	Pseudomonadaceae															
	Pseudomonas koreensis	2.4	-	-	0.673	1.5	3.0	-	-	0.673	2.1	-	-	-	-	0
	Pseudomonas oryzihabitans		-	-	-	0	3.0	-	-	0.673	2.1	-	-	-	-	0
	Xanthomonadaceae															
	Stenotrophomonas maltophilia	9.5	-	-	0.171	6.1	-	-	-	-	0	2.4	-	-	0.673	1.4

H: Healthy; O: Obesity; HTN: Arterial hypertension; TOTAL: Healthy, Obesity and Arterial hypertension; **-**: No results found; [a]Statistical analyses were performed using Chi-Square test.

Furthermore, as demonstrated in **Figure 7**, 86.7% of mother-child pairs presented a simultaneous presence of bacterial species from mothers´ saliva and/or breastmilk, which was statistically significant when compared to mother-child pairs that did not share the same microorganisms (Chi Square test; *P*<0.001). Additionally, we observed that healthy mother-child pairs presented the highest percentage for simultaneous presence of the same bacterial species (Chi-square test; *P*=0.235).

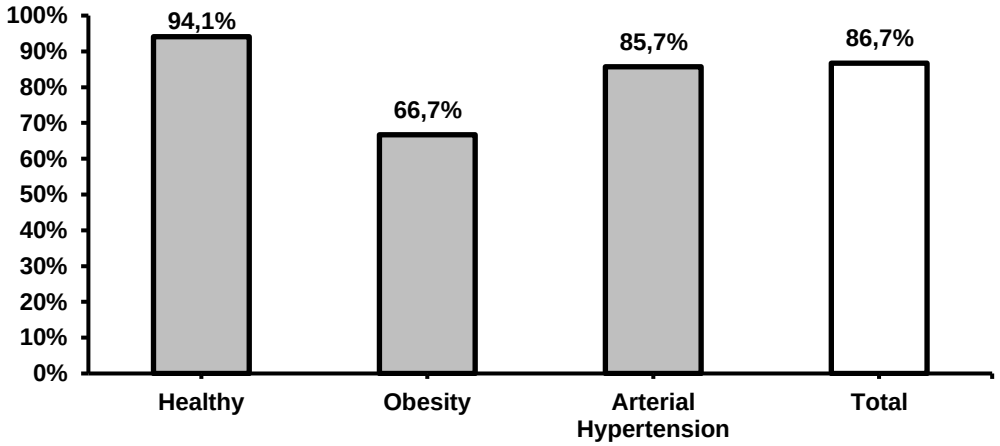


Figure 7: Simultaneous presence (%) of microorganism's species *per* study group.

Additionally, an analysis was conducted regarding the possible different pathways through which the microorganisms can be transmitted from mother to child. Overall, it was verified that in 45.0% (n=18) of the pairs, the child shared the same bacterial species with both mother saliva and breastmilk, 32.5% (n=13) only by breastmilk and 22.5% (n=9) by saliva. Inclusive, this potential transmission through mother saliva and/or breastmilk can be also observed, in **Table VII**. Particular species of *Staphylococcus* were the most shared between mother-child pairs, through mothers´ saliva, breastmilk, or both types of samples. It was observed that *S. epidermidis* (41.7%), followed by *S. aureus* (16.7%), were the most shared species between mother-child pairs. Consequently, the mothers' saliva and/or breastmilk seem to contribute for this potential transmission of microorganisms to the child (**Table VII**). Additionally, the species *K. oxytoca*, *C. braakii*, *C. freundii* were only shared by one mother-child pair in which the mother is a healthcare worker.

Table VII: Simultaneously presence of the microorganisms in mother and child samples.

	Mother saliva and/or breastmilk + Child oral swab	**Mother saliva and breastmilk + Child oral swab**	**Mother saliva + Child oral swab**	**Mother breastmilk + Child oral swab**
S. epidermidis	41.7 (15)	66.7 (10)	20.0 (3)	13.3 (2)
S. aureus	16.7 (6)	83.3 (5)	16.7 (1)	0 (0)
S. hominis	11.1 (4)	25.0 (1)	25.0 (1)	50.0 (2)
S. saprophyticus	8.3 (3)	66.7 (2)	0 (0)	33.3 (1)
S. equorum	2.8 (1)	100 (1)	0 (0)	0 (0)
S. warneri	2.8 (1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
K. oxytoca	2.8 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
C. freundii	2.8 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
C. braakii	2.8 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
S. maltophilia	2.8 (1)	0 (0)	100 (1)	0 (0)
S. marcescens	2.8 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)
E. asburiae	2.8 (1)	0 (0)	0 (0)	100 (1)

Results are shown in prevalence % (number of mother-child pairs).

3.2.2 Microorganism diversity

In this study, the diversity of microorganism species *per* sample type was also analysed (mothers' saliva and breastmilk and children' oral swab samples) as presented in **Figure 8**. Comparing the results obtained, it was observed that a highest diversity of species, was present in healthy mothers (particularly in mothers' saliva) and their children. Additionally, although no differences were observed between the study groups regarding the mother's saliva diversity, we observed that the healthy mother's saliva had a higher diversity when compared to the other risk factor groups (Kruskal-Wallis; P=0.17). Furthermore, a correlation was obtained between the mother's saliva diversity and the child's diversity (Spearman test; P=0.029). On the other hand, the mother's breastmilk diversity and the child's diversity almost achieved a statistically significant correlation (Spearman test; P=0.060).

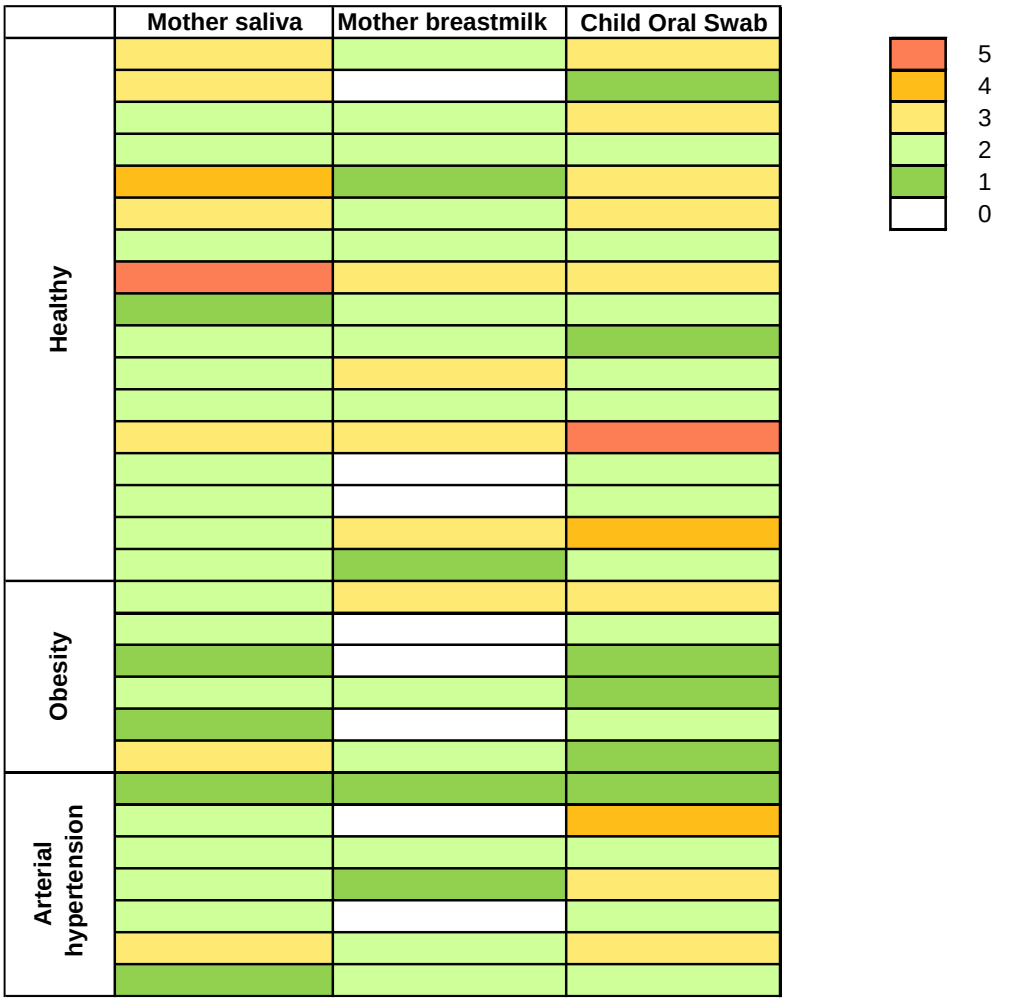


Figure 8: Heat map demonstrating the microorganism diversity *per* sample type for each study group.
Legend: 0 - absence of samples;**1 to 5** - number of bacterial species.

3.2.3 Correlations between the presence of microorganisms and maternal factors

Finally, a statistical analysis was conducted with the purpose of associating the presence of the shared microorganisms in mother-child samples with several and relevant maternal factors. Correlations were only carried out between the same species in order to analyse the possibility of microorganism transmission amidst mother-child pairs. Thus, it was possible to verify that, for different shared *Staphylococcus* species, the statistically significant correlations were mostly observed between mothers' breastmilk and children' oral swab samples (**Table VIII**).

Table VIII: Correlation between microorganisms in mother-child pair samples.

Microorganism shared between mother-child pairs	Type of samples	*P* value[a]
S. aureus	Mother breastmilk/Child oral swab	<0.001
	Mother saliva/Child oral swab	0.002
S. epidermidis	Mother breastmilk/Child oral swab	0.061*****
S. saprophyticus	Mother breastmilk/Child oral swab	0.003
S. hominis	Mother breastmilk/Child oral swab	0.046

[a]Statistical analyses were performed using Chi-Square test.
*****_P_ value not statistically significant (_P_>0.05), however considered relevant for discussion.

Moreover, several correlations were observed between the different maternal factors studied and the presence of the referred *Staphylococcus* species in each type of samples, namely mother saliva (**Table IX**), breastmilk (**Table X**) and child oral swab (**Table XI**). The majority of the correlations obtained for different *Staphylococcus* species were related to specific mothers' habits of infant care, namely pacifier licking (**Table XI**).

Table IX: Correlation between mother saliva microorganisms and maternal factors.

Mother saliva microorganisms	Maternal factors	*P* value[a]
S. aureus	Maternal migraine	0.017
	Maternal asthma	0.028
	Healthcare working mother	0.061*****
	Parental pacifier licking	0.097*****
S. epidermidis	Gestational diabetes	0.057*****
	Parental pacifier licking	0.079*****
S. equorum	Parental pacifier licking	0.015
S. hominis	Complementary means of hygiene	0.003
	Consumption of alcohol since delivery	0.026
S. saprophyticus	Maternal anxiety disorder	0.008

[a]Statistical analyses were performed using Chi-Square test.
*_P_ value not statistically significant (_P_>0.05), however considered relevant for discussion.

Table X: Correlation between mother breastmilk microorganisms and maternal factors.

Mother breastmilk microorganisms	Maternal factors	*P* value[a]
S. aureus	Antibiotic postpartum	0.017
S. epidermidis	Positive preeclampsia screening	0.055*****
S. hominis	Gestational diabetes	0.041

[a]Statistical analyses were performed using Chi-Square test.
*_P_ value not statistically significant (_P_>0.05), however considered relevant for discussion.

Table XI: Correlation between child swab microorganisms and maternal factors.

Child swab microorganisms	Maternal factors	*P* value[a]
S. aureus	Parental pacifier licking	0.097*****
S. epidermidis	Intrapartum antibiotic prophylaxis	0.028
S. equorum	Parental pacifier licking	0.015
S. hominis	Healthcare working mother	0.070*****
S. saprophyticus	Parental pacifier licking	0.032

[a]Statistical analyses were performed using Chi-square test.
**P* value not statistically significant (*P*>0.05), however considered relevant for discussion.

Subsequently, numerous correlations between the diversity of microorganisms and maternal factors can be observed in **Table XII**. Interestingly, it was verified that the diversity of microorganisms in children' oral swab samples correlated positively with the diversity of microorganisms in maternal saliva samples, which corroborates the data presented in **Figure 8**.

Table XII: Correlation between microorganism diversity and maternal factors.

Diversity of microorganism	Maternal factors	Test value; *P* value
Diversity Mother saliva	Healthcare related job	0.324; 0.080*****
Diversity Mother breastmilk	Heart disease	-0.413; 0.032
Diversity Child swab	Maternal Asthma	0.615; 0.001
	Type of delivery (caesarean)	0.451; 0.024
	Parental kisses on child's mouth	0.324; 0.087*****
	Parental pacifier licking	-0.354; 0.070*****

Statistical analyses were performed using Point-Biserial Correlation.
***P* value not statistically significant (*P*>0.05), however considered relevant for discussion.

DISCUSSION

4. Discussion

The seeding and maturation of the child´s microbiome are essential to institute a healthy symbiosis between host and microbiome. Moreover, the mother seems to play a crucial role in the transmission of microorganisms to the child. Despite the vertical mother-child microbiome transmission arguably being the most paramount interplay in early life, the source and transmission routes by which the infants obtain these pioneering microorganisms remain largely unexplored.[19] Thereby, this study arises with the intent to identify potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs and correlate the bacterial profiles detected in the samples with maternal cardiovascular risk factors, as well as other external factors that may potentially affect their colonization.

The carried analysis demonstrated differences between the prevalence of microorganisms and the type of sample, namely mothers' saliva, breastmilk and children' oral swab samples. In gram-positive species, *S. epidermidis*, followed by *S. aureus*, were the most prevalent in saliva samples of mothers with cardiovascular risk factors, as obesity and arterial hypertension. Conversely, *S. epidermidis* and *S. hominis* were the dominant species in breastmilk and children' oral swab from hypertensive and obese mothers, respectively. In fact, *S. epidermidis* mainly colonizes skin and mucous membranes[20], but also frequently detected in oral cavity[21], which is concordant with the obtained results. Also, due to its association with oral inflammations, such as gingivitis and endodontic infections and its involvement in hospital-acquired infections, this microorganism is considered a clinically relevant opportunistic bacteria.[22] Additionally, *S. succinus* was mainly found in children oral swab samples of hypertensive mothers, however there is a lack of reports regarding the presence of this microorganism in the oral cavity. Furthermore, no information was found as regards to its correlation with the child's hypertensive mothers. Concerning *S. aureus,* the oral cavity has shown to be an important reservoir, functioning as a point of dissemination to the lower respiratory tract and cross-infection among individuals.[23] In fact, studies already revealed that *S. aureus*, an opportunistic pathogen, which can cause nosocomial and community-acquired infections, is a common resident species in oral cavity, frequently found in saliva samples, as observed in our study.[24, 25] Besides, *S. aureus* was associated with the healthy study group, particularly in breastmilk and children oral swab samples, confirming other reports which revealed an oral colonization of *S. aureus* amongst healthy adults and children.[26, 27] However, due to the lack of information regarding its status, *S. aureus* is still seen as a transient colonizer of the oral flora.[24] *S. hominis* is known to be common commensal member of the human

microbiome, and occasionally found in the oral cavity.[28] Nevertheless, *S. hominis,* was already associated with bloodstream infections and currently considered an emerging opportunistic pathogen.[25, 28-31] Additionally, *S. saprophyticus,* primary cause of community-acquired urinary tract infections mainly in sexually active women, was clearly correlated with healthy participants.[32] Still, a previous study demonstrated the presence of *S. saprophyticus* in only 5.8% of healthy women, which slightly contradicts our results (16.7%-saliva and 12.1%-breastmilk from healthy mothers). [33] Moreover, there is lack of evidence reporting the presence of *S. saprophyticus* in the oral cavity, being mainly found in other human habitats, as the gastrointestinal tract, vagina and perineum.[32, 34] Thereby, more studies are needed to better understand its oral colonization.

Concerning gram-negative bacteria, overall, the highest prevalence was observed in specific species, which were related with particular samples and/or study groups. Namely, *S. maltophilia* in healthy mother saliva samples, *S. marcescens* and *E. bugandensis* (both 10.0%) in children' oral swab from obese mothers and *S. marcescens* in breastmilk samples also from obese mothers (14.3%). *S. maltophilia* is increasingly recognized as an important cause of nosocomial and community-acquired infections, including associated with multidrug-resistance.[35, 36] Moreover, although not considered highly virulent, *S. maltophilia* infection is associated with high morbidity and mortality rates, which is of concern for immunologically immature individuals, as newborns.[37, 38] *Enterobacter* species, despite being ubiquitous and extremely well adjusted to the environment in healthcare institutions, they are considered one of the "ESKAPE" pathogens (an acronym for *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* species), representing a global threat to human health, due to a large number of infections in clinical and community settings, with limited therapy options.[39, 40] Particularly, *E. bugandensis* is a highly virulent pathogenic species, being associated with neonatal sepsis and several outbreaks, and thereby becoming a clinically relevant pathogen.[41, 42] Regarding *S. marcescens,* an opportunistic pathogen whose clinical significance only emerged recently, although being a rare cause of community-acquired infections, reports have shown its relevance as a nosocomial pathogen, including frequently associated with neonatal outbreaks.[43-46]

Moreover, a high diversity of microorganisms was found in this study (total of 33 bacterial species). The microbiome diversity refers to the number of different species present in an individual and evaluates how evenly the microorganisms are dispersed through the community. The richness of the microbiota species is an important indicator of human health.[47] Contrariwise, the decrease of diversity is a marker of dysbiosis and has been associated with

non-healthy individuals, as cardiovascular risk factors.[48, 49] In fact, in our study, a higher diversity of microorganisms was observed in all three type of samples (mother saliva, breastmilk and child oral swab) of healthy study group, contrasting with the cardiovascular risk groups studied (obesity and arterial hypertension), which were associated with a lower diversity. Additionally, the saliva samples presented a higher number of different species when compared to breastmilk samples, which has also been described by Davé et al. (2016).[49]

In our study, the presence of *S. aureus* and *S. hominis* in samples from mothers with a healthcare-related job and their children were nearly statistically significant. Remarkably, in a particular mother-child pair in which the mother was a healthcare worker, a high diversity of clinically relevant bacteria was detected (*E. faecalis*, *S. aureus*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *C. braaki* and *A. pitti*). Actually, healthcare workers have been recognized as susceptible reservoirs and propagators of pathogenic microorganisms, due to their direct and long-term exposure to infectious agents, including multidrug-resistant.[50-52] Moreover, studies regarding the oral colonization of healthcare workers have demonstrated the presence of diverse opportunistic and pathogenic microorganisms, particularly *Staphylococcus* sp., *E. faecalis* and *Serratia* sp.[52, 53] In particular, *S. aureus* was identified as the principal colonizer of healthcare workers.[52]

The process of oral colonization is influenced by manifold key factors including maternal comorbidities, mode of delivery, maternal antibiotic usage, gestational age at birth, feeding mode and diet.[14, 19, 54-57] Furthermore, other factors such as maternal oral health behaviours and habits that predispose microbe transmission have been associated to the early microbiome acquisition and succession in the infant.[58] Some studies have shown an association with gestational diabetes, the most frequent pregnancy complication, and the child's development of metabolic diseases such as obesity and diabetes mellitus.[59] Our results showed an almost significant correlation between mothers who developed gestational diabetes and the absence of *S. epidermidis* and *S. hominis* in their saliva and breastmilk samples, respectively. In fact, a previous study reported a reduced abundance of the phylum Firmicutes (phylum of *Staphylococcus* sp.) in women with gestational diabetes.[60] Regarding preeclampsia diagnosis, it has been reported a shift in the microbiome composition and consequently a decrease in the microbiome diversity of mothers with a positive preeclampsia screening.[61] In our study *S. epidermidis* nearly obtained a negative correlation with mothers with a positive screening of preeclampsia, corroborated by a report that demonstrated the negative correlation in general with *Staphylococcus* genus.[61] Also, a recent study reported a positive correlation between the bacterial genus, such as *Fusobacterium*, and the presence of a positive preeclampsia

screening.[61] Concerning other diseases, this study showed a positive correlation between the presence of *S. aureus* in mother saliva with asthma. Although the lack of information regarding oral carriage of *S. aureus* and respiratory diseases, it was already suggested a modest association between *S aureus* nasal prevalence and asthma.[62] Furthermore, our study has demonstrated a statistical difference between *S. aureus* in mother saliva samples and migraines. Interestingly, a study has reported a possible association between nitrate-reducing bacteria, such as *S. epidermidis,* including several *Streptococcus* sp*.,* present in the oral cavity and migraines.[63] Also, our study shows a positive correlation between anxiety disorder and *S. saprophyticus.* Nevertheless, there is a scarcity of studies associating mental disorders, such as anxiety, with the oral presence of microorganisms. In regard of certain heart diseases, it was previously shown that there was a decrease of microorganism diversity, which corroborates with our results.[64]

Other clinical factors, as the administration of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis (IAP), is more prevalent in pregnancies in which the children are delivered by caesarean section, in order to prevent the development of complications in newborns.[65] During the perinatal period, the maternal and child exposure to antibiotics has been associated with an increased risk of developing late onset diseases, such as obesity and asthma.[66, 67] It has been demonstrated that this approach causes shifts in the qualitative and quantitative parameters of the oral and breastmilk microbiota.[68] In fact, differences have been identified in the child´s oral microbiota, of mothers administered with IAP, in the early days of life, leading to a decrease in the alpha diversity and microbiome taxonomic stability.[69] For example, it was reported a lower abundance of Actinobacteria and Bacteroidetes phyla, contrasting with the higher levels of Firmicutes phylum.[70] In fact, our study showed a positive association between IAP and the presence of *S. epidermidis* in child´s oral swab. In addition, the postpartum use of antibiotics can alter the child´s microbiome through breastfeeding, causing reduced levels of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* and an increase in *Bacteroides* and *Atopobium.*[71] In our study, we found a positive correlation between the presence of *S. aureus* in breastmilk samples of mothers administered with antibiotics postpartum, but there are no studies analysing these variables, as far as we know. Therefore, further studies are needed to investigate the influence of postpartum antibiotic use on oral microbiome and infant health. The analysis regarding the mother´s alcohol consumption since delivery demonstrated a positive correlation with *S. hominis*. Currently, it is known that alcohol can cause dysbiosis in the gut microbiome, particularly an increase in the presence of gram-negative bacteria and a decrease in the prevalence of Firmicutes phylum, which is the opposite of our findings.[72]

Also, the feeding mode is an essential source of early microbial colonization and allows the maturation of the infant's microbiome. Breastfeeding introduces new microbial communities that stimulates growth, functions as a microbiome modulator and is utmost to the newborn development and health.[73] In fact, infants exclusively breast-fed were reported to present an increased richness of *Streptococcus*, *Staphylococcus, Enterococcus* and *Lactobacillus*.[73] On the other hand, while the abundance of *Clostridium* and *Bacteroides* is significantly higher in formula-fed infants, their pool of skin-associated microorganisms is reduced, due to the lack of skin contact during breastfeeding.[71, 74] Curiously, although breast-fed infants have a more stable and uniform stool of microbes, they have a lower alpha diversity when compared to formula-fed infants, whose gut microbiome is more diverse.[75] However, a study from 2016 showed that formula-fed infants harbour a less diversity of microorganisms in their gut microbiota.[76] Such correlation was not possible to verify in our analysis, because in our study it was included only two infants exclusively formula fed. Nevertheless, the influence of the feeding mode in the development and maturation of the gut microbiome is exceedingly more explored than in the oral microbiome, urging the need for more longitudinal studies.[73, 77]

Other determinant key in the establishment of the initial microbiome, is the delivery mode, which also allows exchanges between mother and child and exposure to a broad variety of microorganisms.[78] Vaginally delivered infants harbour microorganisms that are similar to the mothers vaginal composition, which include higher proportions of *Lactobacillus*, *Prevotella* and *Bacteroides*.[79] Conversely, caesarean-born babies are enriched with microbiota similar to the mother's skin bacteria, dominated by *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Propionibacterium* sp. and *Clostridium difficile.*[79] Regarding our study, no associations were obtained between the microorganism prevalence in the child's oral swab and the type of delivery. Previous articles have demonstrated that caesarean-born infants, contrarily, exhibit a reduced microbial diversity in saliva and have an increased susceptibility for immune and metabolic disorders such as, obesity, diabetes, asthma and allergies.[80] Regarding the microbiome diversity, conversely as shown in our results, infants delivered vaginally come in contact with a greater variety of microorganisms, presenting significantly more bacterial taxa.[81, 82] Thus, concerning the impact of the mother´s factors on the child´s microbiome, our results suggest that the type of delivery has a great impact on the infant´s oral microbiome diversity.

In regards to the microorganism transmission between mother-child pairs, recent studies proved, by Whole Genome Sequencing (WGS), the infant's acquisition of maternal microbes, such as *Streptococcus mutans,* through saliva and breastmilk.[83-86] Other studies, with DNA

fingerprinting by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR), have shown clusters of *Streptococcus* sp. containing highly related strains in mother-child pairs with a high level of similarity from 77.0% up to 94.4%.[87-89] In this study, the majority of mother-child pairs (86.7%) presented a similarity of bacterial species, and correlations between the same microorganism present in the child´s oral swab and mother saliva and/or breastmilk. In addition, the correlation observed between the diversity found in the child oral microbiome and the mother saliva and breastmilk microbiome further reinforces the possible vertical transmission of bacteria from mother to child. Therefore, our study suggests that saliva and breastmilk are possible pathways of microorganism vertical transmission between mothers and their respective children.

Oral health behaviours involve a variety of attitudes and knowledges that conditions the mother and the child´s health. Certain studies have shown that the mother´s oral health during pregnancy is associated with the future child´s oral health.[90, 91] Also, it was reported that a good oral hygiene during pregnancy reduces the transmission of microorganism to infants, particularly *Streptococcus mutans*.[92] Several mother´s health behaviours, as toothbrushing frequency, number of dental visits and the use of complementary means of hygiene, were evaluated and correlated with the remaining variables. In our study we observed an association between the absence of *S. hominis* in the mother saliva and the use of complementary means of hygiene, however there is still scarce literature regarding the impact of oral health hygiene on the oral carriage of this microorganism. Moreover, an association between the mother´s educational level and health behaviours was previously reported, contrasting with our study.[93]

About the mother´s habits of infant care, as licking the pacifier and kissing the mouth, studies have shown that these patterns expose the infants to the parents´ oral microorganisms.[93, 94] In our study, it was verified an association between the parental licking of the pacifier and the presence of *Staphylococcus* sp. in saliva samples, including an association between an increased diversity in child microbiome with mother´s kissing the child on the mouth and a reduction of diversity in children whose mother licked their pacifier. Nevertheless, more studies are needed to better understand the real impact of specific maternal habits and behaviours in on the oral bacteria transmission to the infant and its influence on the child´s microbiome composition and diversity.

Finally, our study presented some limitations, which must be considered in the interpretation of the results. Firstly, this research was initiated with a pilot study in order to verify possible methodological limitations and optimize our protocol and understand the type of results we would obtain. The major limitation encountered was the use of Mitis Salivarius agar,

selective and differential culture medium to detect *Streptococcus* sp. bacteria. In fact, this medium revealed to not be specific for *Streptococcus* sp. due to the detection of other genus bacteria. Besides, it was verified that with this medium was very difficult to obtain some of the most relevant bacteria in the oral cavity such as, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguis,* suggesting the limited potential of Mitis Salivarius agar medium for *Streptococcus* sp. studies. Additionally, MALDI-TOF MS system demonstrated to have a limited discriminatory power for highly related species, as *Streptococcus* sp., which results in misidentifications. Consequently, due to these limitations, it was decided to not proceed for the detection of *Streptococcus* sp. Another limitation was the participants self-reported data, which could introduce unconscious errors while filling the questionnaire, in particular regarding the use of intrapartum antibiotics because most participants do not have the medical records of antibiotic administration during delivery. Lastly, due to the prevention measures against COVID-19, the oral health evaluation conducted in the beginning our study had to be suspended, namely DMFS, CAL>3, BOP and PI. Therefore, only part of our participants undertook this evaluation which means correlations were not carried out as their number was insufficient for a feasible analysis. Despite that, the data obtained from participants with oral health evaluation was not excluded from our results, considering the relevance they may have in future outputs.

Regarding the future perspectives of this study, it will be crucial to confirm the mother-child transmission through strain level analysis, to confirm the bacterial potential pathogenicity by the detection of virulence factors and to verify the antibiotic resistant bacteria by evaluating the antimicrobial susceptibility.

CONCLUSION

5. Conclusion

In summary, in this study, the impact of maternal obesity and arterial hypertension on the oral microbiota composition of the infants was suggested, due to a decrease in microbiome diversity. Consequently, this less diverse microbial community seems to increase the lifelong risk of developing various diseases. Also, it was highlighted a possible vertical transmission of oral opportunistic and pathogenic bacteria acquisition in early-life, via maternal oral contact and breastfeeding routes. In fact, several maternal factors, oral health behaviours, and habits of infant care seem to be crucial for the acquisition of potential pathogenic and opportunistic bacteria. Consequently, this may impact the infants' initial oral colonizers, which play a key role in the development of the oral microbiome and its diversity. Therefore, this study underlines the need to implement oral health programs to reinforce the relevance of an adequate oral health and to create awareness towards the impact of oral health behaviours on the child´s health. Moreover, healthcare professionals should educate parents about infant oral care habits and encourage mothers to periodically undergo an oral check-up, in order to avoid future complications.

Nevertheless, further studies are needed in order to confirm this vertical transmission by strain-level analyses, as well as to better understand how the mother´s oral hygiene can directly impact the child´s microbiome diversity and future oral health.

BIBLIOGRAPHY

6. Bibliography

1. Blum HE. The human microbiome. Adv Med Sci. 2017;62(2):414-20.

2. Xiao J, Fiscella KA, Gill SR. Oral microbiome: possible harbinger for children's health. International Journal of Oral Science. 2020;12(1):12.

3. de Oliveira GLV. Chapter 33 - The Gut Microbiome in Autoimmune Diseases. In: Faintuch J, Faintuch S, editors. Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications: Academic Press; 2019. p. 325-32.

4. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Pérez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. Adv Appl Microbiol. 2016;97:171-210.

5. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral Maxillofac Pathol. 2019;23(1):122-8.

6. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. Biomed Pharmacother. 2018;99:883-93.

7. Hegde S, Munshi AK. Influence of the maternal vaginal microbiota on the oral microbiota of the newborn. J Clin Pediatr Dent. 1998;22(4):317-21.

8. Bagg J, MacFarlane TW, Poxton IR, Smith AJ. Essentials of microbiology for dental students. Oxford: Oxford University Press; 2006. xxix:317 pp.

9. Kleinegger CL, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2246-54.

10. Hill GB. Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. Ann Periodontol. 1998;3(1):222-32.

11. Kim J, DeBate RD, Daley E. Dietary behaviors and oral-systemic health in women. Dent Clin North Am. 2013;57(2):211-31.

12. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:85.

13. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. Bjog. 2002;109(5):527-33.

14. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences.

2010;107(26):11971-5.

15. Wang S, Egan M, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, et al. A good start in life is important-perinatal factors dictate early microbiota development and longer term maturation. FEMS Microbiol Rev. 2020;44(6):763-81.

16. Sampaio-Maia B, Monteiro F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. Dental research journal. 2014;11:291-301.

17. Jeurink P, van bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels L, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: A source of more life than we imagine. Beneficial microbes. 2012;4:17-30.

18. Shao Y, Forster SC, Tsaliki E, Vervier K, Strang A, Simpson N, et al. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. Nature. 2019;574(7776):117-21.

19. Wang S, Ryan CA, Boyaval P, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Maternal Vertical Transmission Affecting Early-life Microbiota Development. Trends in Microbiology. 2020;28(1):28-45.

20. Zawadzki PJ, Perkowski K, Padzik M, Mierzwińska-Nastalska E, Szaflik JP, Conn DB, et al. Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections. Biomed Res Int. 2017;2017:8106491-.

21. Loberto JCS, Martins CAdP, Santos SSFd, Cortelli JR, Jorge AOC. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. Brazilian Journal of Microbiology. 2004;35:64-8.

22. Chapter 3 - Supragingival Microbes. In: Zhou X, Li Y, editors. Atlas of Oral Microbiology. Oxford: Academic Press; 2015. p. 41-65.

23. Lam OL, McGrath C, Bandara HM, Li LS, Samaranayake LP. Oral health promotion interventions on oral reservoirs of *staphylococcus aureus*: a systematic review. Oral Dis. 2012;18(3):244-54.

24. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? Am J Infect Control. 2015;43(1):35-7.

25. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 1):95-9

26. Jackson MS. Staphylococci in the oral flora of healthy children and those receiving treatment for malignant disease. Microbial Ecology in Health and Disease. 2000;12(1):60-4.

27. Jackson MS, Bagg J, Gupta MN, Sturrock RD. Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 1999;38(6):572-5.

28. Coates-Brown R, Horsburgh MJ. Whole-Genome Sequence of *Staphylococcus hominis* Strain J31 Isolated from Healthy Human Skin. Genome Announcements. 2017;5(15):e01548-16.

29. Simões-Silva L, Ferreira S, Santos-Araujo C, Tabaio M, Pestana M, Soares-Silva I, et al. Oral Colonization of *Staphylococcus* Species in a Peritoneal Dialysis Population: A Possible Reservoir for PD-Related Infections? Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018;2018:5789094.

30. Szczuka E, Krzymińska S, Bogucka N, Kaznowski A. Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. Antonie Van Leeuwenhoek. 2018;111(7):1259-65.

31. Pereira EM, de Mattos CS, dos Santos OC, Ferreira DC, de Oliveira TLR, Laport MS, et al. *Staphylococcus hominis* subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles. Scientific Reports. 2019;9(1):11736.

32. Raz R, Colodner R, Kunin CM. Who Are You—*Staphylococcus saprophyticus*? Clinical Infectious Diseases. 2005;40(6):896-8.

33. Marrie TJ, Kwan C, Noble MA, West A, Duffield L. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. Journal of clinical microbiology. 1982;16(3):427-31.

34. Lawal OU, Fraqueza MJ, Bouchami O, Worning P, Bartels MD, Gonçalves ML, et al. Foodborne Origin and Local and Global Spread of *Staphylococcus saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. Emerg Infect Dis. 2021;27(3):880-93.

35. Denton M, Kerr KG. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(1):57.

36. Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):2-41.

37. Prates M, Fernandes F, Proença F, Mussá Y, Tavares A, Pereira A. Oral Infection Caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A Rare Presentation of an Emerging Opportunistic Pathogen. Case Rep Infect Dis. 2020;2020:6346120-.

38. Trifonova A, Strateva T. *Stenotrophomonas maltophilia* - a low-grade pathogen with numerous virulence factors. Infect Dis (Lond). 2019;51(3):168-78.

39. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clinical Microbiology Reviews. 2020;33(3):e00181-19.

40. Pati NB, Doijad SP, Schultze T, Mannala GK, Yao Y, Jaiswal S, et al. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. Scientific Reports. 2018;8(1):5392.

41. Mshana SE, Gerwing L, Minde M, Hain T, Domann E, Lyamuya E, et al. Outbreak of a novel *Enterobacter* sp. carrying *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. Int J Antimicrob Agents. 2011;38(3):265-9.

42. Falgenhauer J, Imirzalioglu C, Falgenhauer L, Yao Y, Hauri AM, Erath B, et al. Whole-Genome Sequences of Clinical *Enterobacter bugandensis* Isolates from Germany. Microbiology Resource Announcements. 2019;8(29):e00465-19.

43. Voelz A, Müller A, Gillen J, Le C, Dresbach T, Engelhart S, et al. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: clinical aspects, risk factors and management. Int J Hyg Environ Health. 2010;213(2):79-87.

44. Yoon HJ, Choi JY, Park YS, Kim CO, Kim JM, Yong DE, et al. Outbreaks of *Serratia marcescens* bacteriuria in a neurosurgical intensive care unit of a tertiary care teaching hospital: a clinical, epidemiologic, and laboratory perspective. Am J Infect Control. 2005;33(10):595-601.

45. Fleisch F, Zimmermann-Baer U, Zbinden R, Bischoff G, Arlettaz R, Waldvogel K, et al. Three consecutive outbreaks of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis. 2002;34(6):767-73.

46. Zingg W, Soulake I, Baud D, Huttner B, Pfister R, Renzi G, et al. Management and investigation of a *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal unit in Switzerland – the role of hand hygiene and whole genome sequencing. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2017;6(1):125.

47. Heiman ML, Greenway FL. A healthy gastrointestinal microbiome is dependent on dietary diversity. Mol Metab. 2016;5(5):317-20.

48. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. Bmj. 2018;361:k2179.

49. Davé V, Street K, Francis S, Bradman A, Riley L, Eskenazi B, et al. Bacterial microbiome of breast milk and child saliva from low-income Mexican-American women and children. Pediatric Research. 2016;79(6):846-54.

50. Moremi N, Claus H, Vogel U, Mshana SE. The role of patients and healthcare workers *Staphylococcus aureus* nasal colonization in occurrence of surgical site infection among patients admitted in two centers in Tanzania. Antimicrobial Resistance & Infection Control.

2019;8(1):102.

51. El-Mahdy TS, Al-Agamy MH, Emara M, Barakat A, Goering RV. Complex Clonal Diversity of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization among Community Personnel, Healthcare Workers, and Clinical Students in the Eastern Province, Saudi Arabia. Biomed Res Int. 2018;2018:4208762-.

52. Fracarolli IFL, Oliveira SAd, Marziale MHP. Colonização bacteriana e resistência antimicrobiana em trabalhadores de saúde: revisão integrativa. Acta Paulista de Enfermagem. 2017;30:651-7.

53. Ssemogerere L, Sendagire C, Mbabazi C, Namungoma Y, Oketayot A, Namuyonga J, et al. Hand Colonization with Gram-Negative Organisms of Healthcare Workers Accessing the Cardiac Intensive Care Unit: A Cross-Sectional Study at the Uganda Heart Institute. Critical Care Research and Practice. 2019;2019:1-8.

54. Van Daele E, Knol J, Belzer C. Microbial transmission from mother to child: improving infant intestinal microbiota development by identifying the obstacles. Crit Rev Microbiol. 2019;45(5-6):613-48.

55. Lemas D, Yee S, Cacho N, Miller D, Cardel M, Gurka M, et al. Exploring the contribution of maternal antibiotics and breastfeeding to development of the infant microbiome and pediatric obesity. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 2016;21.

56. Correction for La Rosa et al., Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014;111(48):17336.

57. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. Cell Host Microbe. 2015;17(5):690-703.

58. Ramadugu K, Bhaumik D, Luo T, Gicquelais RE, Lee KH, Stafford EB, et al. Maternal Oral Health Influences Infant Salivary Microbiome. J Dent Res. 2021;100(1):58-65.

59. Buchanan TA, Xiang AH, Page KA. Gestational diabetes mellitus: risks and management during and after pregnancy. Nat Rev Endocrinol. 2012;8(11):639-49.

60. Fugmann M, Breier M, Rottenkolber M, Banning F, Ferrari U, Sacco V, et al. The stool microbiota of insulin resistant women with recent gestational diabetes, a high risk group for type 2 diabetes. Scientific Reports. 2015;5(1):13212

61. Lv LJ, Li SH, Li SC, Zhong ZC, Duan HL, Tian C, et al. Early-Onset Preeclampsia Is Associated With Gut Microbial Alterations in Antepartum and Postpartum Women. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:224.

62. Davis MF, McCormack MC, Matsui EC. Growing Concerns with *Staphylococcus aureus*

and Asthma: New Territory for an Old Foe? The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. 2019;7(2):616-7.

63. Gonzalez A, Hyde E, Sangwan N, Gilbert JA, Viirre E, Knight R. Migraines Are Correlated with Higher Levels of Nitrate-, Nitrite-, and Nitric Oxide-Reducing Oral Microbes in the American Gut Project Cohort. mSystems. 2016;1(5):e00105-16.

64. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. Circ Res. 2017;120(7):1183-96.

65. 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.

66. Azad MB, Bridgman SL, Becker AB, Kozyrskyj AL. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. Int J Obes (Lond). 2014;38(10):1290-8.

67. Chu S, Yu H, Chen Y, Chen Q, Wang B, Zhang J. Periconceptional and Gestational Exposure to Antibiotics and Childhood Asthma. PLoS One. 2015;10(10):e0140443.

68. Hermansson H, Kumar H, Collado MC, Salminen S, Isolauri E, Rautava S. Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. Front Nutr. 2019;6:4.

69. Yassour M, Vatanen T, Siljander H, Hämäläinen A-M, Härkönen T, Ryhänen SJ, et al. Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. Science Translational Medicine. 2016;8(343):343ra81.

70. Mazzola G, Murphy K, Ross RP, Di Gioia D, Biavati B, Corvaglia LT, et al. Early Gut Microbiota Perturbations Following Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Group B Streptococcal Disease. PLOS ONE. 2016;11(6):e0157527.

71. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010;51(1):77-84.

72. Lee E, Lee J-E. Impact of drinking alcohol on gut microbiota: recent perspectives on ethanol and alcoholic beverage. Current Opinion in Food Science. 2021;37:91-7.

73. Azevedo MJ, Pereira ML, Araujo R, Ramalho C, Zaura E, Sampaio-Maia B. Influence of delivery and feeding mode in oral fungi colonization - a systematic review. Microb Cell. 2020;7(2):36-45.

74. Timmerman H, Rutten N, Boekhorst J, Saulnier D, Kortman G, Contractor N, et al. Intestinal colonisation patterns in breastfed and formula-fed infants during the first 12 weeks of

life reveal sequential microbiota signatures. Scientific Reports. 2017;7.

75. Ma J, Li Z, Zhang W, Zhang C, Zhang Y, Mei H, et al. Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. Scientific Reports. 2020;10(1):15792.

76. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. Science Translational Medicine. 2016;8(343):343ra82.

77. Lewis ZT, Mills DA. Differential Establishment of Bifidobacteria in the Breastfed Infant Gut. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2017;88:149-59.

78. Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, Callaway LK, Morrison M, Nitert MD. Contributions of the maternal oral and gut microbiome to placental microbial colonization in overweight and obese pregnant women. Scientific Reports. 2017;7(1):2860.

79. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(26):11971.

80. Song SJ, Dominguez-Bello MG, Knight R. How delivery mode and feeding can shape the bacterial community in the infant gut. CMAJ. 2013;185(5):373-4.

81. Li Y, Caufield P, Dasanayake AP, Wiener H, Vermund S. Mode of Delivery and Other Maternal Factors Influence the Acquisition of *Streptococcus mutans* in Infants. Journal of dental research. 2005;84:806-11.

82. Lif Holgerson P, Harnevik L, Hernell O, Tanner ACR, Johansson I. Mode of Birth Delivery Affects Oral Microbiota in Infants. Journal of Dental Research. 2011;90(10):1183-8.

83. Regev-Yochay G, Raz M, Carmeli Y, Shainberg B, Navon-Venezia S, Pinco E, et al. Parental *Staphylococcus aureus* Carriage is Associated With Staphylococcal Carriage in Young Children. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2009;28(11).

84. Hameş-Kocabaş EE, Uçar F, Kocataş Ersin N, Uzel A, Alpöz AR. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. Microbiological Research. 2008;163(2):168-72.

85. Esra K, Nurhan O, Yilmaz AD, Berrin O. Vertical and Horizontal Transmission of *Streptococcus Mutans* and Effective Factors: An In Vivo Study. Journal of Advanced Oral Research. 2020;11(2):172-9.

86. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, Rodriguez-Baños M, Campo RD, Fernández

L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. J Hum Lact. 2012;28(1):36-44.

87. Schaumburg F, Alabi AS, Mombo-Ngoma G, Kaba H, Zoleko RM, Diop DA, et al. Transmission of *Staphylococcus aureus* between mothers and infants in an African setting. Clin Microbiol Infect. 2014;20(6):O390-6.

88. Li Y, Ismail AI, Ge Y, Tellez M, Sohn W. Similarity of bacterial populations in saliva from African-American mother-child dyads. J Clin Microbiol. 2007;45(9):3082-5.

89. Damle SG, Yadav R, Garg S, Dhindsa A, Beniwal V, Loomba A, et al. Transmission of mutans streptococci in mother-child pairs. Indian J Med Res. 2016;144(2):264-70.

90. Rigo L, Dalazen J, Garbin RR. Impact of dental orientation given to mothers during pregnancy on oral health of their children. Einstein (São Paulo). 2016;14:219-25.

91. Manchanda K, Sampath N, Sarkar AD. Evaluating the effectiveness of oral health education program among mothers with 6-18 months children in prevention of early childhood caries. Contemp Clin Dent. 2014;5(4):478-83.

92. Paglia L, Colombo S. Perinatal oral health: focus on the mother. Eur J Paediatr Dent. 2019;20(3):209-13.

93. Virtanen JI, Vehkalahti KI, Vehkalahti MM. Oral health behaviors and bacterial transmission from mother to child: an explorative study. BMC oral health. 2015;15:75-.

94. Yilmaz E, Doğan Y, Gürgöze MK, Unal S. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and their parents in eastern Turkey. J Paediatr Child Health. 2002;38(2):183-6.

ATTACHMENTS

7. Attachments

7.1. Ethics Committee Statement

U.PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Exmª Senhora
Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes
Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto

000028

18 MAR 2021

Assunto: Parecer relativamente ao Projeto de Investigação nº 32/2020.
(Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs).

Informo V. Exa. que o projeto supracitado foi analisado na reunião da Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP, no dia 22 de janeiro de 2021.

A Comissão de Ética é **favorável** à realização do projeto tal como apresentado.

O formulário definitivo de apresentação do trabalho, aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP, acompanha a presente comunicação.

A Comissão de Ética recomenda a existência de um seguro de responsabilidade civil e relembra que a inexistência de seguro responsabiliza diretamente os investigadores.

Subject: Recommendation on the research project nº 32/2020.
(Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs).

I hereby inform that the aforementioned project was analyzed on january 22, 2021, by the Ethics Committee for Health of the Faculty of Dental Medicine,

The Ethics Committee is **favourable** to the project execution.

The final submission form approved by FMDUP's Ethics Committee for Health is attached.

The Ethics Committee recommends the existence of liability insurance and recalls that the absence of insurance directly holds researchers accountable.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética para a Saúde, da FMDUP

Pr

Assinado por: Inês Alexandra Costa de Morais Caldas Paiva
Identificação: BI10125794
Data: 2021-03-09 às 10:36:31

Morais Caldas

TELEFONE: +351 22 090 11 00; FAX: +351 090 11 01,
www.fmd.up.pt

7.2. University of Porto Statement

U.PORTO	Unidade de Proteção de Dados	DATA:30/03/2021

PARECER R-3/2021

Nome	Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes
Nº Mecanográfico	201604535
Unidade Orgânica	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP)
Título	Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs
Ticket Nº	2021021315000413

Sumário do Pedido

No âmbito da unidade curricular de "Monografia/Relatório de Estágio", integrada no plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMDUP, pretende a requerente averiguar a prevalência de potenciais bactérias patogénicas e oportunistas na cavidade oral de pares Mãe-Filho, bem como correlacionar esses resultados com a saúde oral materna, dados demográficos, tabágicos e alcoólicos, saúde cardiovascular e desfechos obstétricos e perinatais.

O estudo será realizado no âmbito do projeto "OralBioBorn – The oral microbiome during the first year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a portuguese population", que envolve uma parceria de várias instituições (i3S, U.Porto, CHUSJ e ACTA – Academic Center for Dentistry Amsterdam), e que acompanha uma coorte de grávidas recrutadas no CHUSJ e na Unidade Local de Saúde de Matosinhos (Hospital Pedro Hispano), ao longo da gravidez e para além do parto, recolhendo dados e amostras, da mãe e do filho, até ao primeiro ano de vida deste.

Para a realização do presente estudo, do conjunto de dados e amostras recolhidos para aquele Projeto, a requerente utilizará em concreto os seguintes:

- dados da mãe: idade; grupo de estudo (saudáveis/ hipertensão arterial/ diabetes mellitus/ obesidade); peso e altura; nível de escolaridade; categoria de localidade e tipo de habitação; historial clínico (doenças diagnosticadas, idade do diagnóstico e medicação associada); dados sobre a gravidez e o parto; hábitos tabágicos, alcoólicos, alimentares, de saúde oral e relacionados com a transmissão vertical de microrganismos;
- dados da criança: idade; peso e altura; dados sobre o parto, o aleitamento, hábitos succionais, a vacinação e a história clínica; caracterização social;
- amostras de leite materno e de saliva da mãe e do filho, para análise dos perfis bacterianos.

Os dados e amostras serão acedidos e analisados pela requerente de forma pseudonimizada, sendo cada par Mãe-Filho designado por um código, e ficando a associação destes à identidade das participantes apenas do conhecimento das investigadoras responsáveis do OralBioBorn.

Conclusões

Tendo em conta que este estudo se integra no projeto mais alargado OralBioBorn, o qual, tendo a Universidade do Porto como Responsável Conjunta, está a ser acompanhado pela Unidade de Proteção de Dados para garantia do cumprimento dos requisitos impostos pela legislação aplicável nesta matéria, parece-nos que a aqui requerente poderá avançar com a realização do tratamento de dados, desde que implemente as seguintes medidas adicionais para redução do risco de violação da confidencialidade, bem como da possibilidade de reidentificação das participantes, na eventualidade de acesso indevido ao conjunto de dados:

(1) implementar a exigência de credenciais de acesso ao computador, utilizando palavras-chave fortes;

(2) implementar uma solução de antimalware (antivírus) atualizada, igual ou equiparável à solução disponibilizada pela Universidade do Porto;

(3) implementar as mais recentes atualizações do sistema operativo e outras aplicações e utilitários;

(4) não deixar o computador sem supervisão, quando estiver em utilização;

(5) guardar o computador num local seguro quando não estiver a ser utilizado;

(6) excluir todos os dados que não sejam estritamente necessários para os objetivos deste estudo;

(7) ofuscar alguns dados mais específicos, sempre que possível (nomeadamente, converter todas as datas em idades ou distâncias temporais, consoante o que for considerado mais adequado).

a Encarregada da Proteção de Dados
da Universidade do Porto

Assinado por: **SUSANA RODRIGUES PEREIRA**
Num. de Identificação: BI110940423
Data: 2021.03.31 10:36:14 +0100

Doutora Susana Rodrigues Pereira

U.PORTO	Reitoria da Universidade do Porto	DATA: 19/03/2021

Nome	Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes
Nº Mecanográfico	201604535
Unidade Orgânica	Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP)
Título	Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs
Ticket Nº	2021021315000413

Sumário do Pedido

No âmbito da unidade curricular de "Monografia/Relatório de Estágio", integrada no plano de estudos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da FMDUP, pretende a requerente averiguar a prevalência de potenciais bactérias patogénicas e oportunistas na cavidade oral de pares Mãe-Filho, bem como correlacionar esses resultados com a saúde oral materna, dados demográficos, tabágicos e alcoólicos, saúde cardiovascular e desfechos obstétricos e perinatais.

O estudo será realizado no âmbito do projeto "OralBioBorn – The oral microbiome during the first year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a portuguese population", que envolve uma parceria de várias instituições (i3S, U.Porto, CHUSJ e ACTA – Academic Center for Dentistry Amsterdam), e que acompanha uma coorte de grávidas recrutadas no CHUSJ e na Unidade Local de Saúde de Matosinhos (Hospital Pedro Hispano), ao longo da gravidez e para além do parto, recolhendo dados e amostras, da mãe e do filho, até ao primeiro ano de vida deste.

Para a realização do seu estudo, a requerente utilizará parte do conjunto de dados e amostras do OralBioBorn, incluindo amostras de leite materno e de saliva da mãe e do filho, para análise dos perfis bacterianos.

Os dados e amostras serão acedidos e analisados pela requerente de forma pseudonimizada, designados por códigos, sendo que a associação destes à identidade das participantes será apenas do conhecimento das investigadoras responsáveis do OralBioBorn.

Síntese do parecer da Encarregada da Proteção de Dados

Considerando que este estudo se integra num projeto mais alargado que está a ser acompanhado pela Unidade de Proteção de Dados, parece-nos que a requerente poderá avançar com a realização do tratamento de dados, desde que implemente as medidas recomendadas.

Decisão Reitoral

Uma vez analisado o pedido em questão e tendo em consideração o parecer da Encarregada da Proteção de Dados da Universidade do Porto, com a referência R-3/2021,

☑ autorizo.

☐ não autorizo.

O Vice-Reitor

Assinado por: **Fernando Manuel Augusto da Silva**
Num. de Identificação: BI07817829
Data: 2021.03.31 14:22:24 +0100

Fernando Manuel Augusto da Silva*

* Com delegação de competências do Reitor, Despacho n.º 1861/2020, publicado no *DR*, 2ª série, nº 27 de 7 de fevereiro.

7.3. Compliance of the University of Porto Directives Statement

U.PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

INFORMAÇÃO

Monografia/Relatório de Estágio

(Entrega do trabalho final após cumprimento das diretivas emanadas pelo Serviço de Proteção de Dados da U.Porto)

Informo que, relativamente ao Trabalho com o título: Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs, **foram cumpridas todas as diretivas emanadas pelo Serviço de Proteção de Dados da U.Porto, encontrando-se em condições de ser apresentado em provas públicas.**

18/05/2021

O(A) Estudante

(Nome em maiúsculas): MARIANA COIMBRA BRANCO MARTINS FERNANDES

(Assinatura): Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes

7.4. Author's Statement

U.PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

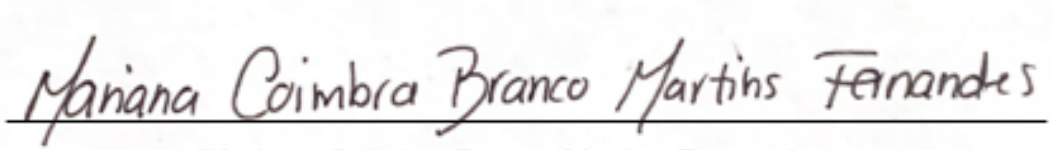
PARECER

Monografia/Relatório de Estágio

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia/Relatório de Estágio, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 18 de Maio de 2021

A estudante



(Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes)

7.5. Advisor's Statement

U.PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

PARECER

(Entrega do Trabalho final da Monografia)

Informo que o Trabalho de Monografia/Relatório de Estágio desenvolvido pela Estudante Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes com o título: *"Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs"*, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 18 de Maio de 2021

A orientadora

(Joana Araújo Alves de Campos)

7.6. Model of Work Disclosure Statement

U.PORTO
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

DECLARAÇÃO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia/Relatório de Estágio

Identificação do autor

Nome completo: Mariana Coimbra Branco Martins Fernandes

Nº identificação civil: 14296277 **Nº Estudante:** 201604535

Email institucional: up201604535@edu.fmd.up.pt

Email alternativo: marianabranco2008@hotmail.com **Tlf/Tlm:** 226178577/911907309

Faculdade/Instituto: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Identificação da publicação

Dissertação de Mestrado Integrado (Monografia) ☒ **Relatório de Estágio** ☐

Título Completo

Impact of maternal obesity and hypertension on the prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in the oral cavity of mother-child pairs

Orientador: Joana Araújo Alves de Campos

Coorientador: Não possuo

Palavras- chave: Oral microbiome; Maternal oral health; Maternal oral behaviour; Mother-Child microbiome transmission; Opportunistic/pathogenic bacteria.

Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: _____(x)

Não autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: __X__(x)

Autorizo a disponibilização do texto integral no Repositório da U.Porto, com período de embargo, no prazo de:

6 meses: _____; 12 meses: __X__; 18 meses: _____; 24 meses: _____; 36 meses: ____; 120 meses: ____;

Justificação para a não autorização imediata: O trabalho será publicado primeiramente numa revista científica

7.7. Participation in Scientific Meetings

7.7.1. National Oral Communications

1. **Fernandes, Mariana**; Campos, Carla; Sampaio-Maia, Benedita; Azevedo, Maria João; Campos, Joana. Detection of potential pathogenic and opportunistic bacteria in breastmilk and saliva from Mother-Child pairs. 14th Meeting of Younger Researchers of University of Porto (IJUP 2021). ONLINE, 5-7 May 2021.
2. **Fernandes, Mariana**; Campos, Carla; Sampaio-Maia, Benedita; Campos, Joana; Azevedo, Maria João. Maternal oral health behaviours impact on oral microbiome transmission between mother-child pairs. 34as Jornadas de Medicina Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa. ONLINE, 10-14 May 2021.
    - One of the 6 investigation posters chosen for oral presentation.

7.7.2. National Poster Communications

1. **Fernandes, Mariana**; Campos, Carla; Sampaio-Maia, Benedita; Campos, Joana; Azevedo, Maria João. Maternal oral health behaviours impact on oral microbiome transmission between mother-child pairs. 34as Jornadas de Medicina Oral da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa. ONLINE, 10-14 May 2021.
    - Included in the Top 50 Posters in the Poster Competition.

2. **Fernandes, Mariana**; Campos, Carla; Sampaio-Maia, Benedita; Azevedo, Maria João; Campos, Joana. Maternal oral health behaviours impact the oral microbiome of mother-child dyads. XVI Jornadas de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa. ONLINE, 21 and 22 of May 2021.

3. **Fernandes, Mariana**; Campos, Carla; Sampaio-Maia, Benedita; Campos, Joana; Azevedo, Maria João. Impact of maternal oral health behaviours on oral microbiome in mother-child pairs. XXXII Edição das Jornadas de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. ONLINE, 25 of May-06 of June 2021.

7.7.3. International Poster Communications

1. **Fernandes, Mariana;** Campos, Joana; Campos, Carla; Ferreira, Ana Filipa; Pires, Inês; Ramalho, Carla; Zaura, Egija; Sampaio-Maia, Benedita; Azevedo, Maria João. Prevalence of potential pathogenic and opportunistic bacteria in breastmilk and saliva from Mother-Child pairs: a Pilot Study. 31st European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (ECCMID). ONLINE, 9-12 July 2021.

2. **Fernandes**, **Mariana**; Campos, Carla; Ferreira, Ana Filipa; Pires, Inês; Ramalho, Carla; Zaura, Egija; Sampaio-Maia, Benedita; Azevedo, Maria João; Campos, Joana. Potential pathogenic and opportunistic bacteria prevalence in breastmilk and saliva from mother-child pairs: a Pilot Study. World Microbe Forum, an American Society for Microbiology (ASM) and Federation of European Microbiological Societies (FEMS) collaboration. ONLINE, 20-24 June 2021.

7.8. Authorization of the Responsible for Access to the Information (Nº294/2018)

Unidade de Investigação

Tomei conhecimento. Nada a opor.

17 de Dezembro de 2018

A Coordenadora da Unidade de Investigação

(Prof.ª Doutora Ana Azevedo)

DIRECÇÃO CLÍNICA

Aprovado. Ao CA. 19/12/2018

(Prof.ª Doutora Ana Azevedo)

n.º 294/18

SÃO JOÃO

PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO

Realização de Investigação

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração
do Centro Hospitalar de São João

AUTORIZADO

CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO DO(A) UNIÃO DE 21 DEZ 2018

Presidente do Conselho de Administração

Diretor Clínico | Enfermeira Diretora | Vogal Executivo | Vogal Executivo

Nome do Investigador Principal:
Benedita Sampaio Maia

Título da Investigação:
The oral Microbiome during the first Year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a Portuguese population (OraLBioBorn).

Pretendendo realizar no(s) Serviço(s) de:
Ginecologia e Obstetrícia

a investigação em epígrafe, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador/Promotor, autorização para a sua efetivação.

Para o efeito, anexo toda a documentação referida no dossier da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/ Faculdade de Medicina da Universidade do Porto respeitante à investigação, à qual enderecei pedido de apreciação e parecer.

Com os melhores cumprimentos. *O Investigador/ Promotor*

Porto, 2 de outubro de 2018 . Benedita Sampaio Maia

assinatura

Centro de Investigação HSJ
RECEBI
3/12/2018

CES-IM005-0

Comissão de Ética Centro Hospitalar São João / / Faculdade de Medicina da Universidade do Porto n.º 294 / 18

SÃO JOÃO

U.PORTO FMUP FACULDADE DE MEDICINA UNIVERSIDADE DO PORTO

Questionário para submissão de Investigação

Exmo. Sr. Presidente da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/ Faculdade de Medicina da Universidade do Porto,

Pretendendo realizar a investigação infracitada, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador, a sua apreciação e a elaboração do respetivo parecer. Para o efeito, anexo toda a documentação requerida.

IDENTIFICAÇÃO DO ESTUDO

Título da investigação: The oral Microbiome during the first Year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the

Nome do investigador: Benedita Sampaio Maia

Endereço eletrónico: bmaia@fmd.up.pt **Contacto telefónico:** 917411727

Caracterização da investigação:

☐ Estudo retrospetivo ☒ Estudo observacional ☒ Estudo prospetivo

☐ Inquérito ☐ Outro. Qual? _____

Tipo de investigação:

☐ Com intervenção ☒ Sem intervenção

Formação do investigador em boas práticas clínicas *(GCP)*: ☐ Sim ☒ Não

Promotor *(se aplicável)*: _____

Nome do orientador de dissertação/tese *(se aplicável)*: _____

Endereço eletrónico: _____

Local/locais onde se realiza a investigação: Serviço de Genecologia e Obstetricia

Data prevista para início: 1 / 1 / 2019 Data prevista para o término: 31 / 12 / 2022

PROTOCOLO DO ESTUDO

Síntese dos objetivos:

Nos últimos anos, tornou-se claro que o microbioma humano tem um enorme impacto na fisiologia humana. Sabendo que a cavidade oral é a porta de entrada do trato gastrointestinal, os microrganismos orais são componentes essenciais para o equilíbrio entre a saúde e a doença, não só a nível oral, mas também a nível sistémico. Assim, este projeto tem como propósito avaliar o microbioma oral (bactérias e fungos) durante o primeiro ano de vida e a influência de fatores maternos na aquisição do microbioma oral do recém-nascido. Por conseguinte, tentaremos responder aos seguintes objetivos:
- Compreender a evolução do ecossistema oral (bacterioma e micobioma) durante o primeiro ano de vida,
- Procurar semelhanças entre o microbioma materno oral e do leite e o microbioma oral recém-nascido,

Fundamentação ética (ganhos em conhecimento/inovação; ponderação benefícios/riscos):

Os primeiros meses de vida parecem ser muito relevantes para a colonização microbiana oral futura, e consequentemente para a saúde oral e sistémica do adulto. Desvendar a influência de fatores maternos na aquisição do microbioma oral do recém-nascido será importante para a melhor compreensão de como se forma uma microbiota oral mais ou menos protetora para a criança e futuro adulto. Este conhecimento será particularmente relevante na área da medicina dentária preventiva, mas poderá também contribuir para o melhor desenvolvimento da criança.
Em termos de benefícios diretos às participantes, estas serão acompanhadas por um médico dentista durante e pós a gravidez.
Em termos de riscos, existem apenas o risco e desconforto inerente a uma consulta de medicina dentária e de colheita de amostras de saliva, urina, sangue, fezes e leite.

CES IM007-0

CONFIDENCIALIDADE

De que forma é garantida a anonimização dos dados recolhidos de toda a informação?

A identificação do participante na base de dados recolhida será feita através de um código totalmente inespecífico criado para este estudo. A chave da codificação só será conhecida pelo investigador principal. Deste modo, será recolhido o consentimento expresso da

O investigador necessita ter acesso a dados do processo clínico? ☒ Sim ☐ Não

Está previsto o registo de imagem ou som dos participantes? ☐ Sim ☒ Não

Se sim, está prevista a destruição deste registo após o sua utilização? ☐ Sim ☐ Não

CONSENTIMENTO

O estudo implica recrutamento de:

Doentes: ☒ Sim ☐ Não Voluntários saudáveis: ☒ Sim ☐ Não

Menores de 18 anos: ☒ Sim ☐ Não

Outras pessoas sem capacidade do exercício de autonomia: ☐ Sim ☒ Não

A investigação prevê a obtenção de Consentimento Informado: ☒ Sim ☐ Não

Se não, referir qual o fundamento para a isenção:

No caso da participação dos recém-nascidos o consentimento será solicitado à mãe.

Existe informação escrita aos participantes: ☒ Sim ☐ Não

PROPRIEDADE DOS DADOS

A investigação e os seus resultados são propriedade intelectual de:

☒ Investigador ☐ Promotor ☐ Ambos ☐ Serviço onde é realizado

☐ Não aplicável Outro: _____

BENEFÍCIOS, RISCOS E CONTRAPARTIDAS PARA OS PARTICIPANTES

Benefícios previsíveis:

Avaliação da saúde oral.

Riscos/incómodos previsíveis:

Inerentes a uma consulta de medicina dentária e recolha de amostras de saliva, urina, sangue, fezes e leite.

São dadas contrapartidas aos participantes:

- *pela participação* ☐ Sim ☒ Não ☐ Não aplicável
- *pelas deslocações* ☐ Sim ☒ Não ☐ Não aplicável
- *pelas faltas ao emprego* ☐ Sim ☒ Não ☐ Não aplicável
- *por outras perdas e danos* ☐ Sim ☒ Não ☐ Não aplicável

CUSTOS / PLANO FINANCEIRO

Os custos da investigação são suportados por:

☒ Investigador ☐ Promotor ☐ Serviço onde é realizado

☐ Não aplicável Outro: _____

Existe protocolo financeiro? ☐ Sim ☒ Não

LISTA DE DOCUMENTOS ANEXOS

- [x] Pedido de autorização ao Presidente do Conselho de Administração do Centro Hospitalar de São João *(se aplicável)*
- [ ] Pedido de autorização à Diretora da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto *(se aplicável)*
- [x] Protocolo do estudo
- [x] Declaração do Diretor de Serviço onde decorre o estudo
  (sendo um estudo na área de enfermagem deve anexar também a concordância da chefia de enfermagem)
- [x] Profissional de ligação
- [ ] Informação dos orientadores
- [x] Informação ao participante
- [x] Modelo de consentimento
- [x] Instrumentos a utilizar *(inquéritos, questionários, escalas, p.ex.)*: _____
- [x] Curriculum Vitae abreviado *(máx. 3 páginas)*
- [ ] Protocolo financeiro
- [ ] Outros:

COMPROMISSO DE HONRA E DECLARAÇÃO DE INTERESSES

Declaro por minha honra que as informações prestadas neste questionário são verdadeiras. Mais declaro que, durante o estudo, serão respeitadas as recomendações constantes da Declaração de Helsínquia (1960 e respetivas emendas), e da Organização Mundial da Saúde, Convenção de Oviedo e das "Boas Práticas Clínicas" (GCP/ICH) no que se refere à experimentação que envolve seres humanos. Aceito, também, a recomendação da CES de que o recrutamento para este estudo se fará junto de doentes que não tenham participado em outro estudo, nos últimos três meses. Comprometo-me a entregar à CES o relatório final da investigação, assim que concluído.

Porto, 2 *de* outubro *de* 2018

Nome legível: Benedita Sampaio Maia

Benedita Sampaio Maia
assinatura

Parecer da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/ FMUP Emitido na reunião plenária da CE de 19 / 10 / 18

A Comissão de Ética para a Saúde tendo aprovado o parecer do Relator, aguarda que o Investigador/Promotor esclareça as questões nele enunciadas para que possa emitir parecer definitivo.

Prof. Doutor Filipe Almeida
Presidente da Comissão de Ética

Centro Hospitalar **São João**

CONSIDERADOS QUE FORAM COMO SATISFATÓRIOS OS ESCLARECIMENTOS PRESTADOS PELO(A) INVESTIGADOR(A), A CES APROVA POR UNANIMIDADE O PARECER DO RELATOR, PELO QUE NADA TEM A OPOR À REALIZAÇÃO DESTE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.

26, 11, 18

Prof. Doutor Filipe Almeida
Presidente da Comissão de Ética

RESPONSÁVEL PELO ACESSO À INFORMAÇÃO

SÃO JOÃO

Pedido de Reutilização de Registos Clínicos para Investigação e Desenvolvimento (I&D)

Número do Pedido
(A preencher pelo Gabinete de Apoio ao RAI)

Exmo. Senhor
Responsável pelo Acesso à Informação
(Artigo 9º da Lei nº 26/2016, de 22 de agosto)
Dr. Rui de Vasconcellos Guimarães

SÃO JOÃO

VASCONCELLOS GUIMARÃES
Administrador Hospitalar

1. Identificação do(s) Investigador(es) (Preenchimento Obrigatório)

1.1. Investigador Principal
Nome: Benedita Sampaio Maia
Contacto telefónico: 917411727
Endereço eletrónico: bmaia @ fmd.up.pt

1.2. Investigador(es) Associado(s)
Número Total:
Nome: Maria João Azevedo
Contacto telefónico: 914568829
Endereço eletrónico: mariajoaomazevedo @ gmail.com

Nome: Carla Maria de Almeida Ramalho
Contacto telefónico: 964883038
Endereço eletrónico: carlaramalho @ med.up.pt

Nome: Inês Falcão Pires
Contacto telefónico: 916274929
Endereço eletrónico: ipires @ med.up.pt

1.3. Afiliação Institucional do Investigador Principal
1.3.1. Grupo Profissional
☐ Médico(a) ☐ Enfermeiro(a) ☒ Docente ☐ Estudante
☒ Outro. Qual? Investigador

1.3.2. Documento de identificação pessoal ou profissional
☒ Cartão de Cidadão ☐ Bilhete de Identidade ☐ Célula Profissional
☐ Cartão de Docente ☐ Cartão de Estudante ☐ Outro. Qual?
Número de Documento: 10535842

2. Enquadramento e Identificação do Trabalho de Investigação e Desenvolvimento (Preenchimento Obrigatório)

2.1. Enquadramento da investigação
☐ Trabalho académico de investigação e desenvolvimento:
☐ Não conferidor de grau
☐ Conferidor de grau: ☐ Licenciatura ☐ Mestrado ☐ Doutoramento
☒ Projeto de investigação e desenvolvimento

RAI-IMD2-0

2.2. Entidade(s) que tutela(m) a investigação

☐ Centro Hospitalar de São João

Serviço:

☒ Universidade do Porto

Faculdade / Instituto: INEB – Instituto Nacional de Engenharia Biomédica / I3S - Instituto de Investigação

☐ Outra Instituição. *Qual?*

Há alguma parceria entre instituições?

☐ Não ☐ Sim. Qual(is)?

2.3. Orientador *se Aplicável*

Contacto telefónico

Endereço eletrónico @

2.4. Título provisório

The oral Microbiome during the first Year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a Portuguese population (OraLBioBorn).

Deverá posteriormente indicar o título definitivo para emissão do Certificado de Reutilização pelo RAI – DAta REuse Certificate for Research – DARE através dos contactos disponíveis no fim deste formulário.

2.5. Acesso requerido

☒ Ficheiro

Descrição do património informacional a que pretende ter acesso, identificando a informação a obter, i.e. nome, morada, diagnóstico, idade, códigos dos distritos, entre outros.

Informação relativa às características demográficas, história pessoal e familiar de doença, história ginecológica e obstétrica, e estilos de vida das participantes.

☒ Consulta de processos clínicos em ambiente papel:

☐ Bloco ☒ Consulta Externa ☐ Hospital de Dia ☒ Internamento ☒ MCDT ☒ Urgência

Deverá anexar ficheiro(s) contendo a identificação do pretendido, i.e. números de processos, episódios, números de utente, entre outros.

Anexar ficheiro no ato de envio

☒ Consulta de registos clínicos eletrónicos

Especificar os Sistemas de Informação:

SAM - Sistema de Apoio ao Médico e ObsCare

Data previsível de fim de utilização das credenciais de acesso 2022 - 12 - 31

☐ Outro Acesso. Qual?

2.3. Pareceres e Autorizações

☐ Autorização da Hierarquia

☐ Protocolo Científico Aprovado [1]

☒ Parecer da Comissão de Ética para a Saúde (CES) [1]

☐ Parecer do Centro de Epidemiologia Hospitalar [1]

Deverá anexar ficheiro(s) contendo cópia dos documentos referentes às opções selecionadas.

Anexar ficheiro no ato de envio

[1] Obrigatório quando aplicável

3. Observações (Preenchimento Facultativo)

4. Aceitação dos Termos e Condições da Reutilização

Cumulativamente com as obrigações decorrentes da lei já citada *(n.º 2 e 3 do artigo 21 e o n.º 1 e 2 do artigo 12, ambos da Lei n.º 26/2016, de 22 de agosto)* ao submeter o presente pedido concordo e fico ainda vinculado aos seguintes termos e condições:

- Comprometo-me a manter confidencial toda a informação à qual vou ter acesso;
- Não vou elaborar registos, susceptíveis de identificar ou tornar identificável a identidade das pessoas a quem os mesmos dizem respeito;
- Não vou elaborar, nem ficar na posse, de cópias de bases de dados utilizadas na recolha de informação;
- Comprometo-me a obter junto da Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPD) as necessárias autorizações, para eventuais bases de dados que venha a conceber e utilizar no âmbito da presente investigação;
- Comprometo-me a devolver ao Centro Hospitalar de São João, na pessoa do seu Diretor Clínico, as bases de dados e o resultado da investigação;
- Comprometo-me a ocultar os elementos de identificação da(s) pessoa(s) a quem os registos digam respeito, em futuras e eventuais publicações de resultados;
- Comprometo-me a consultar os processos clínicos nas instalações que me forem indicadas para o efeito;
- Comprometo-me a obter os necessários pareceres, quer da Comissão de Ética do Hospital, quer do Centro de Epidemiologia Hospitalar, sempre que necessário;
- Comprometo-me a citar as fontes sempre que publicitar o trabalho de investigação independentemente de requerer a Certidão de Reutilização (DAta REuse Certificate for Research – DARE);
- Tomei conhecimento, que a violação de qualquer dos compromissos aqui assumidos, resultará no apuramento de responsabilidades disciplinares, civis e penais e ainda, à impossibilidade futura de aceder a informação de saúde para fins de investigação.

5. Decisão do investigador sobre requerer a DAta REuse Certificate for Research – DARE (Preenchimento Obrigatório)

☒ Pretendo desde já requerer a Certidão de Reutilização (DARE) cujo sentido, valor e significado consultei em *http://portal-chsj.min-saude.pt/pages/710*.

☐ Não pretendo requerer a Certidão de Reutilização (DARE) cujo sentido, valor e significado consultei em *http://portal-chsj.min-saude.pt/pages/710*.

6. Assinatura

Nota 1: Se o presente pedido for submetido eletronicamente ou for assinatura digital qualificada, os posteriormente vem ao Centro Hospitalar de São João exibir o seu documento de identificação pessoal, ou no âmbito do seu espaço de liberdade e como manifestação expresso do seu consentimento envio cópia do referido documento, neste caso, concluído o processo ser-lhe-á devolvido ou eliminado a cópia do documento de identificação pessoal, conforme as indicações que dê.
Nota 2: Se o presente pedido for entregue presencialmente, assina e exibe o documento de identificação a quem recebe o pedido.

Data 2018 - 10 - 02

Benedita Sampaio Nu
Investigador Principal

Em caso de dúvida no preenchimento contacte através dos endereços eletrónicos
rai.reutilizacao.id@chsj.min-saude.pt **ou** ruiguimaraes@chsj.min-saude.pt
ou pelos números de telemóvel 962 204 194 **ou** 918 880 299

SUBMETER

7.9. Authorization of the Responsible for Access to the Information (86/CE/JAS)

UNIDADE LOCAL DE SAÚDE DE MATOSINHOS HOSPITAL PEDRO HISPANO	INFORMAÇÃO	Nº [redacted] Data: 09-10-2020

Para: Serviço de Gestão do Conhecimento
De: Comissão de Ética

Assunto: Apreciação ao pedido de autorização para realização de estudo intitulado "**The oral Microbiome during the first year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in Portuguese population (OralBioBorn)**"

INFORMAÇÃO

Exmo. Senhor,

A Comissão de Ética para a Saúde apreciou o pedido de autorização para realização de estudo intitulado "**The oral Microbiome during the first year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in Portuguese population (OralBioBorn)**" investigadores são: Maria Benedita Garrett de Sampaio Maia Marques, Inês Pires Marques, Carla Almeida Ramalho, Maria João Azevedo, Ana Filipa Ferreira da FMUP, e elo de ligação na ULSM a Dra. Inês Sarmento Gonçalves Assistente Hospitalar no Serviço de Ginecologia/Obstetrícia.

A Comissão de Ética para a Saúde da ULSM deliberou, por unanimidade, nada opor à realização deste estudo, desde que sejam anexados exemplares dos questionários a utilizar e que já foram utilizados no estudo PERIMYR.

Com os melhores cumprimentos

Dr. José Alberto Silva
Presidente da Comissão de Ética
da ULSM Matosinhos

Dr. José Alberto Silva
(Presidente da Comissão de Ética da ULSM, E.P.E.)

7.10. Participant Information sheet

Explicação do Estudo

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações se não estiver completamente esclarecido/a.

Título do Estudo:

O microbioma oral ao longo do primeiro ano de vida e a influência de fatores maternos na aquisição do microbioma oral do recém-nascido numa população portuguesa. [The oral Microbiome during the first Year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a Portuguese population (OraLBioBorn).]

Objetivo:

A boca do seu(sua) filho(a) adquire microrganismos (germes) logo após o nascimento. Os microrganismos presentes na boca do seu filho vão ser muito importantes para a sua saúde oral e geral no futuro enquanto adulto. Este estudo tem como objetivo investigar o que pode influenciar a aquisição de microrganismos na boca do seu filho durante o primeiro ano de vida.

Metodologia:

O presente estudo prevê a avaliação da sua saúde oral (consulta de medicina dentária) antes, durante e após a gravidez e a colheita de amostras de saliva, urina, fezes, sangue e leite (pós-parto). Ao(à) seu(sua) filho(a) serão colhidas amostras de saliva (com um tipo especial de cotonetes) e fezes (da fralda). A avaliação da saúde oral e a colheita das amostras serão efetuados por profissionais de saúde, devidamente certificados e treinados para a função, e em ambiente adequado, no Departamento de Cirurgia e Fisiologia – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, ou no serviço de Ginecologia e Obstetrícia não causando qualquer risco para a saúde da participante e do bebé.

Resultados/Benefícios:

Espera-se com este estudo encontrar diferenças na prevalência de bactérias potencialmente patogénicas e oportunistas correlacionando com os dados demográficos, saúde oral maternal, tabágicos e alcoólicos, saúde cardiovascular e desfechos obstétricos e perinatais das Mães. Consequentemente, espera-se que essas diferenças repercutem para o bebé devido à potencial transmissão vertical materna.

7.11. Informed Consent

CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE



SÃO JOÃO

PARA INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

Considerando a "Declaração de Helsínquia" da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996, Edimburgo 2000, Seoul 2008, Fortaleza 2013)

Designação do Estudo *(em português)*

The oral Microbiome during the first Year of life and the influence of maternal factors in the acquisition of the new-born oral microbiome in a Portuguese population (OralBioBorn).

Confirmo que expliquei ao participante/ representante legal, de forma adequada e compreensível, a investigação referida, os benefícios, os riscos e possíveis complicações associadas à sua realização.

Informação escrita em anexo: ☐ Não ☒ Sim (Nº de páginas 1)

O Investigador responsável

Nome: Benedita Sampaio Maia _____ Benedita Sampaio Maia _____

legível assinatura

Identificação do participante

Nome: _____

BI/CC nº: _____

Participante/ Representante legal

·Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar: os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto.

·Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão.

·Fui informado da possibilidade de livremente recusar ou abandonar a todo o tempo a participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que é prestada.

·Declaro não ter sido incluído em nenhum outro projeto de investigação nos últimos três meses.

Concordo com a participação neste estudo, de acordo com os esclarecimentos que me foram prestados, como consta neste documento, do qual me foi entregue uma cópia.

Data: ___/___/___ _____

assinatura

Nome *(Pais/Representante legal)*: _____

BI/CC nº: _____ Grau de parentesco: _____

Data: ___/___/___ _____

assinatura

7.12. Mother Questionnaire

Data de Preenchimento: |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Data de Nascimento: |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Grupo de Estudo:

☐ Saudáveis ☐ Hipertensão Arterial ☐ Diabetes Mellitus ☐ Obesidade

|_|_| **Semanas após o Parto**

I Avaliação antropométrica

Peso |_|_|_| kg

Altura |_|_|_| cm

II Socio-demográfico

2.1. Qual o seu nível de escolaridade?

☐ Básico ☐ Secundário ☐ Licenciatura ☐ Mestrado ☐ Doutoramento

2.2. Qual a categoria em que se integra a localidade onde reside?

☐ Cidade ☐ Vila ☐ Aldeia

2.3. Como caracteriza a sua habitação?

☐ Moradia Isolada ☐ Casa Germinada ☐ Condomínio Fechado ☐ Bairro Social ☐ Prédio

III Hábitos Tabágicos

3.1. Fuma ou alguma vez fumou regularmente (mais do que um cigarro por dia)?

☐ Sim ☐ Não

3.1.1. Com que idade começou a fumar? |_|_| anos |_| Não Aplicável

3.1.2 Em que períodos da sua vida fumou o maior número de cigarros? Quantos?

Entre os |_|_| e |_|_| anos Nº cigarros/dia: |_|_| cigarros |_| Não Aplicável

3.1.3. Atualmente, quantos cigarros fuma por dia, em média? |_|_|_| |_| Não Aplicável

3.1.4. Se é ex-fumadora, com que idade parou de fumar? |_|_| anos |_| Não Aplicável

3.1.5. Se deixou de fumar durante a gravidez, com quantas semanas parou? |_|_| semanas

|_| Não Aplicável

1º Trimestre |_|_|_| cigarros/dia
2º Trimestre |_|_|_| cigarros/dia

3.2. Se deixou de fumar durante a gravidez, com quantas semanas recomeçou após o parto?

|_|_| semanas |_| Não recomecei a fumar |_| Não Aplicável (Não sou fumadora)

IV Hábitos alcoólicos

4.1. Quantas bebidas alcoólicas ingere? |_|_|_| dia/semana/mês |_| Não aplicável

4.2. Se deixou de beber bebidas alcoólicas durante a gravidez, com quantas semanas recomeçou após o parto? |_|_| semanas |_|Não recomecei a ingestão de bebidas alcoólica

|_| Não aplicável

4.3. O que consome mais frequentemente (pode assinalar mais do que 1 opção)?

☐ Cerveja ☐ Vinho ☐ Bebidas brancas ☐ Outros _____ ☐ Não Aplicável

V Caracterização Clínica

5.1. Antes de engravidar, alguma vez um médico lhe diagnosticou uma doença que obrigue ou tenha obrigado a tratamento continuado? (Antes de assinalar Não, devem ser consideradas todas as doenças indicadas, bem quaisquer outras que sejam relevantes)

☐ Sim ☐ Não

5.1.1. Se sim, qual(ais) e quando é que lhe foi(oram) diagnosticada(s)?

		Idade de Diagnóstico
Depressão	☐	☐ anos
Esgotamento/ Sobrecarga	☐	☐ anos
Transtorno de ansiedade	☐	☐ anos

Distúrbios do sistema nervoso (epilepsia, esclerose múltipla)	☐	☐ anos
Dislipidemia (ex. colesterol elevado)	☐	☐ anos
Diabetes (não gestacional) Insulinoterapia Sim|_| Não|_|	☐	☐ anos
Hipertensão arterial (não gestacional)	☐	☐ anos
Alergias. Qual(ais)?_____	☐	☐ anos
Rinite	☐	☐ anos
Asma	☐	☐ anos
Bronquite Crónica	☐	☐ anos
Doença do coração. Qual(ais)? (EAM, IC, arritmias, angina)	☐	☐ anos
Doença dos rins. Qual(ais)?	☐	☐ anos
Cancro. Qual(ais)?	☐	☐ anos
Tratamento	☐	
- Cirurgia. Qual?_____	☐	
- Radioterapia	☐	
- Quimioterapia	☐	
Perturbação da visão. Qual(ais)?_____	☐	☐ anos
Problemas de audição. Qual(ais)?_____	☐	☐ anos
Enxaqueca	☐	☐ anos
Osteoartrite	☐	☐ anos
Reumatismo	☐	☐ anos
Perda óssea	☐	☐ anos
Doenças infeciosas crónicas? Qual(ais)?_____	☐	☐ anos
Outro. Qual?_____	☐	☐ anos
Outro. Qual?_____	☐	☐ anos
Outro. Qual?_____	☐	☐ anos

5.2. Tomou recentemente ou toma algum medicamento (terapia crónica, ácido fólico, vitaminas, analgésicos, antibióticos, medicamentos para dormir, produtos naturais, etc)?

☐ Sim ☐ Não

5.2.1. Se sim, qual(ais)? Qual o motivo de administração, quantas vezes tomava por dia e em datas iniciou e finalizou o tratamento? Qual a frequência da utilização?

Nome Comercial e Dosagem	Motivo	Inicio (Data)	Nº tomas/dia	Fim	Ritmo da Toma
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)

				_| _|_|S _|_|D	_| Episódico, em SOS _| De forma descontinuada, mas frequente _| Contínuo (diariamente)
				_| _|_|S _|_|D	_| Episódico, em SOS _| De forma descontinuada, mas frequente _| Contínuo (diariamente)
				_| _|_|S _|_|D	_| Episódico, em SOS _| De forma descontinuada, mas frequente _| Contínuo (diariamente)
				_| _|_|S _|_|D	_| Episódico, em SOS _| De forma descontinuada, mas frequente _| Contínuo (diariamente)

5.3. Em relação à sua última gravidez:

Resultado obstétrico _____
Obs. [2] _____
Data do fim da gravidez __/__/____
N.º fetos (ao nascimento) (nº/NS) _____
Idade gestacional (semanas, dias/NS) _____
Sexo (M/F/NS) _____
Malformações congénitas[a] (S/N) _____
Tipo de Parto (E/F/V/C) [3] _____
Diabetes Gestacional (S/N) _____
Tratamento antibiótico profilático (*Streptococcus agalactiae* S/N) _____
Outro Tratamento antibiótico _____
Se sim, qual o motivo _____
Aleitamento materno (S/N) _____
Se Sim, durante quanto tempo? (meses)
a) Em exclusivo
b) Suplementado

(1) Resultado obstétrico: NV-nado-vivo, FM-feto morto>24sem, AE-Aborto espontâneo, AI-Aborto induzido, IMG-Interrupção médica da gravidez, GE-Gravidez ectópica, DT-doença do trofoblasto.
(2) Obs.: Registar, caso tenha ocorrido, MN-Morte neonatal (<28dias), MNP-Morte pós-neonatal (28dias a 1ano), Mx-Morte aos x anos.
(3) Tipo de parto: E-Eutócico, F-Forceps, V-Ventosa, C-cesariana.

(a)_____

5.4. Após o parto teve algum tipo de complicação?

☐ Sim ☐ Não

5.4.1. Se sim, qual(ais) e a data? _____

_____

5.5. Esteve internada após o parto? Se sim, quantas vezes?

☐ Sim _\|_\| vezes ☐ Não

5.5.1. Se sim, por que motivo(s)?_____

5.6. Fez alguma cirurgia no último mês?

☐ Sim ☐ Não

5.6.1. Qual o motivo?_____

VI Hábitos de Saúde Oral

6.1. Quantas vezes visitou o seu dentista no último ano? _____

6.1.1. Qual o motivo da consulta?

☐ Vigilância/Rotina ☐ Urgência ☐ Tratamento ☐ Extração

☐ Prótese ☐ Destartarização/Polimento ☐ Não sei/Não responde

6.2. Quantas vezes escova os dentes por dia? _____

6.2.1. Em que alturas do dia? _____

6.3. Usa algum meio complementar de higiene oral, para além da escova dentária?

☐ Sim ☐ Não

6.3.1. Se sim, quais? Pode assinalar mais do que uma opção. |_| Não aplicável

☐ Escovilhão ☐ Fio/Fita dentária ☐ Jato de água ☐ Elixir/Colutório

☐ Outro: _____

VII Transmissão Vertical de Microrganismos

7.1. O seu filho tem hábitos succionais?

☐ Sim ☐ Não

7.1.1. Se sim, quais destes?

☐ Chupeta ☐ Dedo ☐ Outro:_____

7.2. Lambe a chupeta do seu filho para a higienizar?

☐ Sim ☐ Não

7.3. Costuma beijar o seu filho na boca?

☐ Sim ☐ Não

VIII Hábitos alimentares

8.1. Tem alguma restrição alimentar (por doença ou por opção)?

☐ Sim ☐ Não

8.1.1. Qual?

☐ Glúten ☐ Carne ☐ Peixe ☐ Derivados animais ☐ Outros _____ ☐ Não Aplicável

8.2. Durante a gravidez alterou os seus hábitos alimentares?

☐ Sim ☐ Não

7.13. Child Questionnaire

Data de Preenchimento: |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Data de Nascimento: |_|_| / |_|_| / |_|_|_|_|

Grupo de Estudo (relativo à mãe):

☐ Saudáveis ☐ Hipertensão Arterial ☐ Diabetes Mellitus ☐ Obesidade

|_|_| Semanas de vida

I Avaliação antropométrica

Peso |_|_|_| kg

Altura |_|_|_| cm

II Caracterização Clínica

1. A criança tomou ou toma algum medicamento (ferro, vitamina D, para cólicas, etc)?

☐ Sim ☐ Não

1.1. Se sim, qual(ais)? Qual o motivo de administração, quantas vezes tomava por dia e em que datas iniciou e finalizou o tratamento? Qual a frequência da utilização?

Nome Comercial e Dosagem	Motivo	Inicio (Data)	Nº tomas/dia	Fim	Ritmo da Toma
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)
				|_| |_|_|S |_|_|D	|_| Episódico, em SOS |_| De forma descontinuada, mas frequente |_| Contínuo (diariamente)

2. Após o parto (ou desde a última avaliação) a criança teve algum tipo de complicação?

☐ Sim ☐ Não

2.1. Se sim, qual(ais) e a data? _____

_____

3. A criança esteve internada após o parto (ou a última avaliação)? Se sim, quantas vezes?

☐ Sim |_|_| vezes ☐ Não

3.1. Se sim, por que motivo(s)?_____

4. Informações sobre o parto (preencher apenas no 1º questionário após nascimento).

4.1 Local: _____

4.2 Peso ao nascer (g): _____

4.3 Comprimento (cm): _____

4.4 perímetro cefálico (cm): _____

4.5. Índice Apgar ao 1ºmin: _____ ao 5º min: _____

4.6. Foi necessária reanimação (S/N): _____

5. Aleitamento

	Data de Inicio (semanas de vida)	Data de Fim (semanas de vida)	Frequência	
Leite materno			☐ Ocasionalmente	☐ Diariamente
Leite artificial			☐ Ocasionalmente	☐ Diariamente
Outros			☐ Ocasionalmente	☐ Diariamente

Se "Outros" por favor especifique: _____

6. Vacinação atualizada?

☐ Sim ☐ Não

Se não, qual(ais) as vacinas em falta? _____

III Caracterização Social

1. Quem é o principal cuidador da criança?

☐ Mãe ☐ Outro familiar ☐ Ama ☐ Creche ☐ Outro

Se "Outro familiar" por favor especifique: _____

Se "Outro" por favor especifique: _____

2. Na mesma habitação onde a criança mora, por favor indique:

N° de adultos	_____	
N° de outras crianças	_____	
N° de animais de estimação	_____	Quais: _____

3. Qual o tempo que a criança passa ao ar livre?

☐ > 4h/dia ☐ 2-3h/dia ☐ 1h/dia ☐ 3-5h/semana ☐ 1-2h/semana ☐ Raramente