

---

# TÉCNICA DE REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (QPCR) EN TIEMPO REAL PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN SALIVA Y BIOPELÍCULA DENTARIA DE NIÑOS<sup>1</sup>

## REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (QPCR) FOR THE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* IN SALIVA AND DENTAL BIOFILM IN CHILDREN<sup>1</sup>

GUSTAVO MONCADA<sup>2</sup>, LORENA DEL CARMEN DUPERAT<sup>3</sup>, PATRICIA PALMA<sup>4</sup>, GINO CORSINI<sup>5</sup>, MIGUEL NEIRA<sup>6</sup>,  
EVELYN REYES<sup>7</sup>, OSMIR BATISTA OLIVEIRA JUNIOR<sup>8</sup>, SIMONE FALEIROS<sup>9</sup>, VALERIA GORDAN<sup>10</sup>, ISMAEL YÉVENES<sup>11</sup>

**RESUMEN. Introducción:** el objetivo del presente estudio consistió en implementar la técnica de qPCR en tiempo real para identificar y cuantificar la especie *Streptococcus mutans* en muestras de saliva y biopelícula dentaria. **Métodos:** se seleccionaron al azar 27 niños de 8 años de edad, de nivel socio-económico bajo del área norte de la región metropolitana de Santiago de Chile, que se citaron en ayunas y sin cepillado durante al menos 12 horas, para coleccionar saliva no estimulada y un pool de biopelícula dentaria supragingival de todas las caras mesio-vestibulares de dientes anteriores y posteriores. Se cuantificó la cantidad de *S. mutans* en las muestras mediante qPCR empleando partidores que amplifican un fragmento del gen *gtfB* de *S. mutans*. **Resultados:** la amplificación presentó 98% de eficiencia con delta de fluorescencia de 3,36 ciclos. La curva de fusión (melting) presentó un solo máximo a una misma temperatura para todas las muestras. **Conclusión:** la metodología permite la identificación y cuantificación específica del gen *gtfB* de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dentaria, de forma rápida y exacta, aportando a la determinación del riesgo cariogénico individual.

**Palabras clave:** *S. mutans*, qPCR, gen *gtfB*, biopelícula dentaria, saliva.

Moncada G, Duperat L, Palma P, Corsini G, Neira M, Oliveira Junior O et al. Técnica de reacción de polimerasa en cadena (qPCR) en tiempo real para la identificación y cuantificación de *Streptococcus Mutans* en saliva y biopelícula dentaria de niños. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 28(1): 71-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n1a4>

**ABSTRACT. Introduction:** the objective of this study was to use real-time qPCR to identify and quantify the *Streptococcus mutans* species in samples of saliva and dental biofilm. **Methods:** 27 children were randomly chosen with the following criteria: 8 years of age, low socio-economic levels, residing in the northern metropolitan area of Santiago de Chile; they were asked to attend an appointment while fasting with no teeth brushing for at least 12 hours, in order to collect non-stimulated saliva and a pool of supragingival dental biofilm of all the mesio-vestibular sides of anterior and posterior teeth. The amount of *S. mutans* in the samples was quantified by qPCR using primers that amplify a fragment of the *gtfB* gene of *S. mutans*. **Results:** the amplification showed 98% efficiency with a fluorescence of 3.36 cycles. The melting curve presented a single maximum at the same temperature for all samples. **Conclusion:** the methodology allows the specific identification and quantification of gene *gtfB* of *S. mutans* in saliva and dental biofilm in a quick and reliable manner, contributing to the identification of individual cariogenic risk.

**Key words:** *S. mutans*, qPCR, *gtfB* gen, dental biofilm, saliva.

Moncada G, Duperat L, Palma P, Corsini G, Neira M, Oliveira Junior O et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the identification and quantification of *Streptococcus mutans* in saliva and dental biofilm in children. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 28(1): 71-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n1a4>

- 1 Adscrito al Proyecto Fonis SAE 13i20205
- 2 DDS, PhD, Escuela Dental, Universidad Mayor de Santiago, Chile
- 3 DDS, Química, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela Dental, Universidad de Chile
- 4 DDS, Microbiología, Departamento de Patología Oral, Escuela Dental, Universidad de Chile
- 5 BQ Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile
- 6 BQ, Química, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela Dental, Universidad de Chile
- 7 DDS, Química, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela Dental, Universidad de Chile
- 8 DDS PhD, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Escuela Dental, Departamento de Odontología Restauradora, Araraquara, Brasil
- 9 DDS PhD Cariología, Escuela Dental, Universidad de Chile
- 10 DDS MS Departamento de Odontología Restauradora, Ciencias Odontológicas, División de Operatoria Dental, College of Dentistry, University of Florida
- 11 BQ Química, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela Dental, Universidad de Chile

- 1 Appointed to Fonis Project SAE 13i20205
- 2 DDS, PhD, Dental School, Universidad Mayor, Santiago, Chile
- 3 DDS, Chemistry, Basic Science Department, Dental School, Universidad de Chile
- 4 DDS, Microbiology, Department of Oral Pathology, Dental School, Universidad de Chile
- 5 BQ Centro de Investigación Biomédica, School of Health Sciences, Universidad Autónoma de Chile
- 6 BQ, Chemistry, Basic Science Department, Dental School, Universidad de Chile
- 7 DDS, Chemistry, Basic Science Department, Dental School, Universidad de Chile
- 8 DDS PhD, Universidade Estadual Paulista, UNESP, School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Araraquara, Brazil
- 9 DDS PhD Cariology, Dental School, Universidad de Chile
- 10 DDS MS Department of Restorative Dentistry, Division of Operative Dentistry Department, College of Dentistry, University of Florida
- 11 BQ Chemistry, Basic Science, Dental School, Universidad de Chile

RECIBIDO: AGOSTO 19/2014 - ACEPTADO: JULIO 19/2016

SUBMITTED: AUGUST 19/2014 - ACCEPTED: JULY 19/2016

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es aún la enfermedad crónica más prevalente en los seres humanos.<sup>1</sup> Su frecuencia se incrementa constantemente con la edad hasta alcanzar a casi el 100% de la población entre 65 y 70 años de edad en Chile; en los niños en edad escolar afecta al 85% en Chile.<sup>2-4</sup>

Es una enfermedad de etiología multifactorial, microbiológicamente inducida, asociada a la fermentación de hidratos de carbono. Es definida como el desbalance mineral y proteico de los dientes, con pérdida neta de minerales en forma irreversible cuando las lesiones se encuentran en estado cavitado. Factores como ocasión, frecuencia y tipo de ingesta de alimentos, deficiencias en las técnicas de control de la biopelícula dentaria, bajos niveles de fluoruros en el ambiente oral y baja tasa de secreción salival constituyen algunos de los determinantes ecológicos que modulan las variaciones de la biopelícula.<sup>5</sup>

La biopelícula oral de pacientes libres de lesiones de caries está constituida por más de mil especies diferentes; sin embargo, los pacientes con enfermedad activa de caries presentan reducción de más del 70% de las especies, mostrando predominio de la microbiota acidogénica asociada con el inicio y progresión de la enfermedad.<sup>5</sup> La bacteria *Streptococcus mutans* es una de las especies tradicionalmente responsables del inicio de las lesiones, junto a otras especies productoras de ácidos, como *Streptococcus sobrinus*, *Veillonella* y *Lactobacillus spp.*<sup>6-8</sup> También se reconoce la microbiota productora de álcalis que conduce al balance del pH y del microbioma oral, como son *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* y *A naeslundii*, entre otros.<sup>9-11</sup>

La actividad deletérea de la especie *S. mutans* se asocia con su capacidad para producir ácido láctico a partir de la sacarosa, llegando a niveles capaces de provocar la pérdida neta de minerales de los dientes.<sup>7, 12-14</sup>

## INTRODUCTION

Tooth decay is still the most prevalent chronic disease in humans.<sup>1</sup> Its frequency steadily increases with age, affecting almost 100% of the Chilean population aged 65 to 70 years; it affects 85% school-age children in Chile.<sup>2-4</sup>

This disease has a multifactorial etiology, which is microbiologically induced and associated to the fermentation of carbon hydrates. It is defined as an imbalance of proteins and minerals in teeth, with irreversible loss of minerals when lesions are in their cavitated state. Factors such as time, frequency, and type of food intake, deficiencies in techniques of dental biofilm control, low levels of fluoride in the oral environment, and low rate of salivary secretion are some of the ecological determinants influencing variations in biofilm.<sup>5</sup>

The oral biofilm in caries-free patients contains more than one thousand different species; however, patients with active caries have a reduction of more than 70% of species, with dominance of the acidogenic microbiota associated with the onset and progression of the disease.<sup>5</sup> The bacterium *Streptococcus mutans* is one of the species traditionally responsible for the onset of lesions, along with other acid-producing species, such as *Streptococcus sobrinus*, *Veillonella* and *Lactobacillus spp.*<sup>6-8</sup> Other alkalis-producing microbiota has been identified as it influences pH balance and the oral microbiome, such as *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus salivarius* and *A naeslundii*, to name just a few.<sup>9-11</sup>

The deleterious activity of *S. mutans* spp. is associated with its ability to produce lactic acid from sucrose, reaching levels capable of causing the loss of minerals in teeth.<sup>7, 12-14</sup>

El *Streptococcus* es el género bacteriano más numeroso en la cavidad oral. Según su filogenia, se clasifica en tres grupos (bovis, pneumonia y viridans),<sup>15</sup> y a su vez el grupo viridans se divide en otros cinco grupos: mitis, mutans, salivarius, anginosus y sanguinis.<sup>15</sup> El grupo Mutans Streptococci (MS) es clasificado, según la secuencia nucleotídica de su RNA ribosomal 16S, en ocho especies (*mutans*, *sobrinus*, *cricketus*, *dawnei*, *ferus*, *macacae*, *ratti* y *hyovaginalis*); de estos, *S. mutans* es considerada la especie más dominante en la cavidad oral.<sup>16</sup>

*S. mutans* es una especie cocácea, Gram positiva, que se agrupa en cadenas; es inmóvil, catalasa negativo, rápido productor de ácido láctico, y su hábitat usual es la superficie dentaria, aunque también ha sido detectado en válvulas cardíacas y placas de ateroma en los grandes vasos.<sup>17</sup>

La virulencia de *S. mutans* se caracteriza por su acidogénesis, aciduria, acidofilia, síntesis de polisacáridos extracelulares (PEC), síntesis de polisacáridos intracelulares, síntesis de proteínas lectinas que ligan al glucano (Gpbs), adhesinas, proteínas asociadas a la pared celular (WapA) y bacteriocinas. La síntesis de polisacáridos extracelulares es un factor destacado de su virulencia, dado que antes de que la sacarosa ingrese a la célula, un porcentaje es transformado por las exoenzimas, glucosiltransferasas (Gtfs) y fructosiltransferasas (Ftf), que metabolizan la molécula de sacarosa en monosacáridos, transfiriendo cada fracción a una molécula receptora y formando polímeros que se pueden difundir en la biopelícula o permanecer asociados a *S. mutans*.<sup>18, 19</sup>

*S. mutans* posee tres tipos distintos de genes *gtf* que expresan actividad de glucosiltransferasa. Los genes *gtfB* y *gtfC* comparten un mismo operón y codifican las enzimas GtfB y GtfC, y el gen *gtfD*, que no está en el locus *gtfBC*, codifica para la enzima GtfD. Estas enzimas (Gtfs) condicionan el rol agresivo de la biopelícula, mediante la producción de glucanos a partir de sacarosa, que se unen al esmalte, proporcionando sitios de colonización y matriz insoluble.<sup>16</sup> GtfB sintetiza glucanos insolubles que se adhieren a la

*Streptococcus* is the most abundant bacterial genus in the oral cavity. According to its phylogeny, it is classified into three groups (bovis, pneumonia and viridans),<sup>15</sup> and the viridans group is divided into five groups: mitis, mutans, salivarius, anginosus, and sanguinis.<sup>15</sup> The *Mutans Streptococci* group (MS) is classified, according to the nucleotide sequence of its 16S ribosomal RNA, in eight species (*mutans*, *sobrinus*, *cricketus*, *dawnei*, *ferus*, *macacae*, *ratti*, and *hyovaginalis*); of these, *S. mutans* is considered as the predominant species in the oral cavity.<sup>16</sup>

*S. mutans* is a Gram-positive coccus which groups itself in chains; it is motionless, catalase negative, a fast producer of lactic acid, and its usual habitat is the dental surface, although it has also been detected in heart valves and in atheromatous plaques of large blood vessels.<sup>17</sup>

The virulence of *S. mutans* is characterized by its acidogenesis, aciduria, acidophile, synthesis of extracellular polysaccharides (EPS), synthesis of intracellular polysaccharides, synthesis of glucan-binding proteins (Gpbs), adhesins, wall-associated protein A (WapA), and bacteriocins. The synthesis of extracellular polysaccharides is a prominent factor of its virulence, since even before the sucrose enters the cell, a percentage is transformed by exoenzymes, glucosyltransferases (Gtfs) and fructosyltransferases (Ftf), which metabolize sucrose in monosaccharide molecules, transferring each fraction to a receiving molecule and forming polymers that can be spread in the biofilm or remain associated with *S. mutans*.<sup>18, 19</sup>

*S. mutans* has three different types of *gtf* genes expressing glucosyltransferase activity. Genes *gtfB* and *gtfC* share a same operon, encoding enzymes GtfB and GtfC as well as gene *gtfD*, which is not in the *gtfBC* locus, encoding for enzyme GtfD. These enzymes (Gtfs) condition the aggressive role of biofilm through the production of glucans from sucrose, which adhere to the enamel, providing sites of colonization and insoluble matrix.<sup>16</sup> GtfB synthesizes insoluble glucans that adhere to the

superficie dentaria. GtfC produce glucanos solubles e insolubles fácilmente metabolizables. *S. mutans* produce tres enzimas diferentes para actuar sobre el mismo sustrato y formar polisacáridos; este hecho determina que *S. mutans* contribuya a la formación y composición de la biopelícula cariogénica, a diferencia de otros microorganismos orales.<sup>18, 20</sup>

Tradicionalmente, altos recuentos de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dentaria se han relacionado con la actividad de la caries. Sin embargo, a pesar de que esta evidencia ha sido cuestionada durante los últimos años, existen numerosos reportes en los que mayores recuentos de esta bacteria se detectan en individuos con caries, razón por la cual el recuento de *S. mutans* se ha utilizado como un indicador de riesgo cariogénico.<sup>21-23</sup>

Inicialmente, la cuantificación se desarrolló mediante el cultivo tradicional, pero con los avances tecnológicos se ha demostrado que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real puede ser una metodología sensible y rápida, lo que ha revolucionado el campo de las formas de cuantificación.<sup>24, 25-28</sup> Esta técnica basada en fluorescencia,<sup>15, 29</sup> a diferencia de la cuantificación por cultivo, no requiere personal entrenado para detectar colonias compatibles con *S. mutans*, las cuales adicionalmente necesitan confirmación a nivel de especie, que puede ser mediante pruebas bioquímicas o moleculares, considerando que este laborioso proceso de cultivo, aislamiento e identificación demanda mayor tiempo y recursos, y comparada con la cuantificación por qPCR resulta más rápida, económica, precisa y sensible; su único inconveniente consiste en que no discrimina la cuantificación entre células vivas y muertas.<sup>24, 30-31</sup>

Por otra parte, esta técnica mejorada de la PCR de tiempo final o convencional, que es un ensayo cualitativo, permite realizar mediciones cualitativas y cuantitativas de genes específicos en una muestra de ácido nucleico. Un ejemplo de ello es SYBR-Green, que corresponde a un método de detección fluorométrica, diseñado para amplificar una secuencia de DNA que no exceda los 250 pb,<sup>24</sup>

dental surface. GtfC produces soluble and non-soluble glucans that are easily metabolizable. *S. mutans* produces three different enzymes to act on the same substrate to form polysaccharides; this fact allows *S. mutans* to contribute to the formation and composition of cariogenic biofilm, unlike other oral microorganisms.<sup>18, 20</sup>

Traditionally, high counts of *S. mutans* in saliva and dental biofilm have been linked to carious activity. However, while this evidence has been challenged over the past years, there are numerous reports claiming that higher counts of this bacteria are detected in individuals with caries, and thus the count of *S. mutans* has been used as an indicator of cariogenic risk.<sup>21-23</sup>

In the past, quantification was conducted through traditional cultivation, but technological advances have demonstrated that real-time polymerase chain reaction (PCR) can be a sensitive, quick methodology, revolutionizing the field of quantification methods.<sup>24, 25-28</sup> Unlike quantification by cultivation, this fluorescence-based technique<sup>15, 29</sup> does not require trained staff to detect colonies compatible with *S. mutans*, which needs an additional step of species confirmation, which can be done through biochemical or molecular tests; this arduous process of cultivation, isolation, and identification requires more time and resources, and compared against quantification by qPCR is faster, inexpensive, accurate, and sensitive; its only drawback is that it does not discriminate quantification between living and dead cells.<sup>24, 30-31</sup>

On the other hand, this improved technique of conventional PCR, which is a qualitative test, allows conducting qualitative and quantitative measurements of specific genes in a sample of nucleic acid. An example of this is SYBR-Green, a fluorometric detection method designed to amplify a DNA sequence not exceeding 250 pb,<sup>24</sup>

donde el reactivo se une inespecíficamente a la doble hebra de DNA produciendo fluorescencia cuantitativa proporcional al número de moléculas iniciales,<sup>29, 32-35</sup> lo que da como resultado una cuantificación exacta, sensible y rápida.

La utilización de la biología molecular en cariología tiene como objetivo desarrollar herramientas para la detección precoz de factores de riesgo que desequilibran el ecosistema oral, para implementar enfoques preventivos y establecer medidas protectoras que eviten la aparición de lesiones de caries y su posible transmisión.

Basado en esta información, el objetivo de este trabajo fue implementar la metodología de qPCR en tiempo real para la detección y cuantificación de la especie *Streptococcus mutans* en muestras congeladas de saliva y biopelícula dentaria provenientes de niños de 8 años de edad, basado en la amplificación de un fragmento del gen *gtfB*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de esta investigación fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, mediante acta 012-13 W.

Para este estudio se utilizaron las cepas bacterianas descritas en la tabla 1, y los partidores para las ampliificaciones tanto de PCR convencional (tiempo final) como de qPCR que se detallan en la tabla 2.

where the reagent non-specifically binds to a double DNA strand producing quantitative fluorescence proportional to the initial number of molecules,<sup>29, 32-35</sup> resulting in an accurate, sensitive, and fast quantification.

The use of molecular biology in cariology is intended to develop tools for the early detection of risk factors that destabilize the oral ecosystem, in order to implement preventive approaches and to establish protective measures to prevent the appearance of carious lesions and their possible transmission.

Based on this information, the objective of this research project was to implement the methodology of real-time qPCR to detect and quantify *Streptococcus mutans* spp. in frozen samples of saliva and dental biofilm from children 8 years of age, based on the amplification of a fragment of the *gtfB* gene.

## MATERIALS AND METHODS

The protocol of this research project was approved by the Scientific Ethical Committee of Universidad de Chile School of Dentistry, through Affidavit 012-13 W.

This study used the bacterial strains described in table 1, and the amplification primers for both conventional PCR (end-point) and qPCR as described in table 2.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Bacteria	Características	Fuente
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Cocáceo Gram positivo, aerobio facultativo, acidófilo, acidúrico, acidogénico.	Centro de Investigación Biomédica Universidad Autónoma de Chile.
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Cocáceo Gram positivo, aerobio facultativo.	Centro de Investigación Biomédica Universidad Diego Portales.
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil.	Centro de Investigación Biomédica Universidad Autónoma de Chile.

**Table 1. Bacterial strains**

Bacteria	Features	Source
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Gram-positive coccus, facultative aerobe, acidophilus, aciduric, acidogenic.	Biomedical Research Center Universidad Autónoma de Chile.
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Gram-positive coccus, facultative aerobe,	Biomedical Research Center Universidad Diego Portales.
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Gram-negative bacillus, facultative aerobe, mobile.	Biomedical Research Center Universidad Autónoma de Chile.

Tabla 2. Secuencias de partidores utilizados para reacciones de PCR y qPCR, previamente reportados por Yoshida y colaboradores<sup>36</sup> y Gordan y colaboradores.<sup>9</sup>

Partidor	Secuencia
<i>Smut</i> 3368-F	5´-GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT-3´
<i>Smut</i> 3481-R	5´-GCCATACACCACTCATGAATTGA-3´
16Sr RNA-F	5´-ACTACGTGCCAGCAGCC-3´
16Sr RNA-R	5´-CCTAATCTATGGGACCATCAGG-3´

Table 2. Sequences of primers used for PCR and qPCR, previously reported by Yoshida et al<sup>36</sup> and Gordan et al.<sup>9</sup>

Primer	Sequence
<i>Smut</i> 3368-F	5´-GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT-3´
<i>Smut</i> 3481-R	5´-GCCATACACCACTCATGAATTGA-3´
16Sr RNA-F	5´-ACTACGTGCCAGCAGCC-3´
16Sr RNA-R	5´-CCTAATCTATGGGACCATCAGG-3´

## Muestra

Para este estudio se seleccionaron al azar (Random Numbers Generation, Microsoft 2007, Seattle, Washington, USA) 27 niños de 8 años, de ambos sexos, provenientes de escuelas municipales del área norte de la región metropolitana de Santiago, Chile, que cumplieran con los siguientes criterios:

**Criterios de inclusión:** a) tener 8 años de edad, b) estar sistémicamente sano, c) no presentar contraindicaciones para participar en un examen dental.

**Criterios de exclusión:** a) pacientes con flujo salival reducido, b) pacientes con enfermedades sistémicas que impidan su tratamiento dental, c) pacientes que hayan estado en terapia antibiótica, con esteroides o con colutorio oral, durante los últimos tres meses.

Los padres de los niños que cumplieran con los criterios de inclusión, y que aceptaron que sus hijos participaran en el estudio, firmaron el formulario de asentimiento informado.

## Sample

This study involved a random selection (Random Numbers Generation, Microsoft 2007, Seattle, Washington, USA) of 27 children of both sexes aged 8 years, from local schools in the northern metropolitan area of Santiago, Chile, who met the following criteria:

**Inclusion criteria:** a) 8 years of age, b) systemically healthy, c) with no contraindications to participate in a dental examination.

**Exclusion criteria:** a) patients with reduced salivary flow, b) patients with systemic diseases preventing them from dental treatment, c) patients who have been on antibiotic therapy, with steroids or mouthwash, during the past three months.

The parents of children meeting the inclusion criteria signed an informed consent form accepting their children's participation in the study.

## Obtención de muestras y procedimiento

Los niños examinados debían abstenerse de cualquier procedimiento de higiene oral e ingesta de alimentos durante las últimas 12 horas previas a la toma de muestras.<sup>9</sup>

Obtención de saliva: Se colectaron 5 mL de saliva no estimulada, en la mañana, en un tubo de plástico estéril de 15 mL, mantenido a 4 °C hasta su traslado al laboratorio de química (Facultad de Odontología, Universidad de Chile). La saliva se transfirió a tubos de centrifuga de 1,5 mL para su posterior análisis en el laboratorio de Microbiología (Facultad de Odontología, Universidad de Chile).

Obtención de biopelícula supragingival dental: La biopelícula se colectó en todas las superficies dentarias mesio-vestibulares de dientes anteriores y posteriores, temporales y permanentes, con curetas estériles (GR 4/5, Gracey finishing curettes, Ransom and Randolph, Toledo, OH, USA). Este pool se transfirió a tubos de centrifuga de 1,5 mL estériles que contenían 500 µL de solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7), y se almacenó a 4 °C hasta su traslado al laboratorio.

Conservación de las muestras: Las muestras de saliva y biopelícula dentaria previamente rotuladas se almacenaron a -80 °C para su posterior procesamiento.

## Extracción de DNA genómico de saliva y biopelícula

Para la extracción de DNA se empleó el sistema MasterPure™ DNA purification, Epicentre® (Illumina Co, San Diego, CA, USA). Las muestras de saliva y biopelícula dental se descongelaron a temperatura ambiente y se resuspendieron mediante agitación en vortex (Cole-Parmer Vortex Mixer, Vernon Hills, IL, USA) por 30 seg. Se depositaron 150 µL de saliva o biopelícula dental en tubos de centrifuga de 1,5 mL y se adicionaron 150 µL de solución (2x) T y C (MasterPure™). Se agregaron 5 µL de lisozima (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se incubó por 1 hora a 37 °C.

## Sample collection and processing

The examined children were required to refrain from any oral hygiene procedure and food intake during the 12 hours prior to sampling.<sup>9</sup>

Saliva collection: 5 mL of non-stimulated saliva were collected in the morning in a 15 mL sterile plastic tube, which was maintained at 4 °C until brought to the Chemistry Laboratory (School of Dentistry, Universidad de Chile). The saliva was transferred to 1.5 mL centrifuge tubes for further analysis in the Microbiology Laboratory (School of Dentistry, Universidad de Chile).

Collection of supragingival dental biofilm: biofilm was collected from all the mesio-vestibular surfaces of temporary and permanent anterior and posterior teeth, using sterile curettes (GR 4/5, Gracey finishing curettes, Ransom and Randolph, Toledo, OH, USA). This pool was brought to 1.5 mL sterile centrifugal tubes containing 500 µL of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM solution (pH 7) and stored at 4 °C until being transferred to the laboratory.

Conservation of samples: the saliva and dental biofilm samples adequately labeled were stored at -80 °C for further processing.

## Extraction of genomic DNA from saliva and biofilm

DNA extraction was conducted with the MasterPure™ DNA purification system, Epicentre® (Illumina Co, San Diego, CA, USA). The samples of saliva and dental biofilm were defrosted to room temperature and re-suspended by agitation in vortex (Cole-Parmer Vortex Mixer, Vernon Hills, IL, USA) for 30 sec. 150 µL of saliva or dental biofilm were put in 1.5 mL centrifuge tubes, adding 150 µL of solution (2lx) T & C (MasterPure™) and 5 µL of lysozyme (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubating for 1 hour at 37 °C.

Posteriormente se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se incubó a 65 °C durante una hora agitando cada 5 min, se agregaron 2  $\mu\text{L}$  RNasa (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) y se incubó 5 min a 37 °C. Posteriormente los tubos se depositaron en hielo durante 3 a 5 min para luego agregar 150  $\mu\text{L}$  de amortiguador MPC (MasterPure™) y se agitó en vortex por 10 seg. Luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 37 °C y se transfirieron 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol puro, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. A continuación se eliminó el isopropanol, se lavó con 150  $\mu\text{L}$  de etanol (75%), y se volvió a centrifugar a 13.000 rpm por 5 min a 4 °C. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se rehidrató en 45  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril. El DNA obtenido se almacenó a -20 °C.

### Extracción de DNA genómico de *Streptococcus mutans* UA159

Para elaborar una curva estándar de cuantificación, se realizó el cultivo de *Streptococcus mutans* UA159. Esta bacteria creció en condiciones microaerófilas a 37 °C en caldo TSB (Oxoid, Hampshire, UK) durante 48 horas. Se centrifugaron 3 mL del cultivo a 13.000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de solución T y C (sistema MasterPure™). Se continuó el protocolo del mismo modo descrito anteriormente.

### Extracción de DNA genómico de *S. sanguinis*

Como control de especificidad de los partidores en las reacciones de PCR, se empleó DNA genómico de cepa *Streptococcus sanguinis* ATTC10556. Esta bacteria creció en condiciones microaerófilas a 37 °C en caldo TSB (Oxoid) durante 48 horas, y para la extracción del DNA genómico de *S. sanguinis* se realizó idéntico procedimiento al descrito para *S. mutans*.

Then, 1  $\mu\text{L}$  of proteinase K was added (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubating at 65 °C for 1 hour and stirring every 5 min; 2  $\mu\text{L}$  of RNase were added (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubating for 5 min at 37 °C. The tubes were later deposited on ice for 3 to 5 min before adding 150  $\mu\text{L}$  of MPC buffer (MasterPure™), stirring in vortex for 10 sec and centrifuging to 13,000 rpm for 10 min at 37 °C; 400  $\mu\text{L}$  of the supernatant were transferred to a new tube. 400  $\mu\text{L}$  of pure isopropanol were added, mixing by inversion and centrifuging at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. Then the isopropanol was removed, rinsing with 150  $\mu\text{L}$  of ethanol (75%), centrifuging again at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C. The precipitate was left to dry at room temperature and rehydrated in 45  $\mu\text{L}$  ultrapure sterile water. The obtained DNA was stored at -20 °C.

### Extraction of genomic DNA of *Streptococcus mutans* UA159

To obtain a standard quantification curve, *Streptococcus mutans* UA159 was cultivated. This bacterium grew in microaerophilic conditions at 37 °C in TSB broth (Oxoid, Hampshire, UK) for 48 hours. 3 mL of culture were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was removed adding 300  $\mu\text{L}$  of T & C solution (MasterPure™ system). The protocol continued as described above.

### Extraction of genomic DNA of *S. sanguinis*

Genomic DNA of *Streptococcus sanguinis* ATTC10556 strain was used as control of specificity of primers in the PCR reactions. This bacterium grew in microaerophilic conditions at 37 °C in TSB broth (Oxoid) for 48 hours, and genomic DNA of *S. sanguinis* was extracted using an identical procedure as described for *S. mutans*.



## Extracción de DNA genómico de *E. coli*

Como control negativo para las reacciones de PCR se empleó DNA genómico de la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que se obtuvo a partir de un cultivo de *E. coli* en agar M<sup>c</sup>Conkey (Becton Dickinson<sup>®</sup>, NJ, USA). Se seleccionó una colonia y se inoculó en 5 mL de caldo nutritivo, los cuales se hicieron crecer en agitación a 37 °C durante 12 h. Posteriormente, a partir de 3 mL de cultivo, se extrajo DNA genómico siguiendo el protocolo descrito para *S. mutans*.

## Separación de DNA mediante electroforesis

El análisis de integridad de las muestras de DNA se realizó mediante separación electroforética (Major Science MJ 105S/MT108, Saratoga, CA, USA) en gel de agarosa al 1% empleando amortiguador TAE 0,5X (Winkler, Lampa, Santiago, Chile). Una vez cumplido el tiempo, se tiñó con bromuro de etidio por 5-10 min y se visualizó en el transiluminador UV a 254 nm.

## Comprobación de partidores en PCR tiempo final

Para comprobar que el DNA amplificado correspondía a DNA bacteriano, se realizó PCR en tiempo final (TF) con partidores universales para bacterias *16Sr RNA* (tabla 2), los cuales generan un fragmento de DNA de 296-350 pb.<sup>8</sup>

Para el procedimiento se realizó una mezcla maestra (*master mix*) para PCR (5  $\mu$ L de amortiguador de reacción 10X, 4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1  $\mu$ L de dNTPs 10mM c/u, 1 $\mu$ L de partidor *16Sr RNA-F* 25 pmol/ $\mu$ L, 1 $\mu$ L de partidor *16Sr RNA-R* 25 pmol/ $\mu$ L, 33,5  $\mu$ L de agua ultrapura, 0,5  $\mu$ L de Taq polimerasa 5UI/ $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y 4  $\mu$ L de DNA purificado: DNA genómico de *S. mutans*, *S. sanguinis*, *E. coli*, saliva y biopelícula dental). Las reacciones de PCR se realizaron en termociclador multigene gradient (Labnet<sup>®</sup> Edison, NJ, USA), empleando el siguiente programa: 94 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos

## Extraction of genomic DNA of *E. coli*

Genomic DNA of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain was used as negative control for the PCR reactions. This strain was obtained from a culture of *E. coli* in M<sup>c</sup>Conkey agar (Becton Dickinson<sup>®</sup>, NJ, USA). A culture was selected and inoculated in 5 mL of nutrient broth, and grown by shaking at 37 °C for 12 hours. Subsequently, using 3 mL of culture, genomic DNA was extracted by following the protocol described for *S. mutans*.

## Separation of DNA by electrophoresis

The analysis of integrity of DNA samples was made by electrophoretic separation (Major Science MJ 105S/MT108, Saratoga, CA, USA) in 1% agarose gel using TAE 0,5X buffer (Winkler, Lampa, Santiago, Chile). Once completed, it was stained with ethidium bromide for 5-10 min observing in UV transilluminator at 254 nm.

## Verification of primers in end-point PCR

To verify that the amplified DNA corresponded to bacterial DNA, end-point PCR was conducted with universal primers for bacteria *16Sr RNA* (table 2), which produce a fragment of DNA of 296-350 pb.<sup>8</sup>

This procedure implied making a master mix for PCR (5  $\mu$ L of reaction buffer 10X, 4  $\mu$ L of MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1  $\mu$ L of dNTPs 10 mM each, 1 $\mu$ L of primer *16Sr RNA-F* 25 pmol/ $\mu$ L, 1 $\mu$ L of primer *16Sr RNA-R* 25 pmol/ $\mu$ L, 33.5  $\mu$ L ultrapure water, 0.5  $\mu$ L Taq polymerase 5UI/ $\mu$ L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 4  $\mu$ L of purified DNA: genomic DNA of *S. mutans*, *S. sanguinis*, *E. coli*, saliva and dental biofilm). The PCR reactions were performed in thermal cycler multigene gradient (Labnet<sup>®</sup> Edison, NJ, USES), using the following plan: 94 °C during 5 min, followed by 40 cycles

de 94 °C durante 30 seg. 50 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Igual procedimiento se utilizó para determinar la especificidad de los partidores para *S. mutans* (tabla 2). Empleando el siguiente programa: 94 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min, se obtuvo un fragmento de 114 pb.

### **Cuantificación de DNA total de saliva y biopelícula dental**

Para determinar la concentración del DNA total de las muestras de DNA genómico de saliva, biopelícula dental y *S. mutans* UA159, se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría por microplacas (Take3 Modelo Epoch, Biotek<sup>R</sup>, Winooski, VT, USA). Se tomaron 2 µL de cada muestra por duplicado y los valores obtenidos de DNA total se llevaron a un volumen final de 20 ng/µL.

### **Cuantificación de *S. mutans* mediante qPCR**

Para la curva estándar se preparó una dilución seriada de factor 10 y se tomaron cinco veces 1 µL de DNA de *S. mutans* UA159 más 9 µL de agua miliQ. Se realizó una mezcla maestra para la reacción de qPCR (10 µL de Mix 2X SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5 µL de partidor *Smut 3368-F* 25 pmol, 0,5 µL de partidor *Smut 3481-R* 25 pmol, 4 µL de agua miliQ, y 5 µL de DNA de las muestras). Para los controles sin templado (NTC) se utilizaron 5 µL de agua miliQ.

En cada pocillo se cargaron 15 µL de mezcla maestra más 5 µL de DNA de *S. mutans*; las mediciones se hicieron por duplicado para los controles (NTC), la construcción de la curva estándar y la cuantificación de cada muestra. Posteriormente se cubrió la placa con sello óptico, según instrucciones del fabricante.

of 94 °C during 30 sec. 50 °C during 1 min, 72 °C during 1 min, and a final extension at 72 °C during 10 min.

The same procedure was used to determine the specificity of primers for *S. mutans* (table 2), using the following program: 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 sec, 60 °C for 30 sec, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min, obtaining a fragment of 114 pb.

### **Quantification of total DNA of saliva and dental biofilm**

To determine the total concentration of DNA of samples of genomic DNA from saliva, dental biofilm, and *S. mutans* UA159, the quantification was carried out with spectrophotometry by microplates (Take3 Model Epoch, Biotek<sup>R</sup>, Winooski, VT, USA). 2 µL of each sample were taken in duplicate and the obtained values of total DNA were brought to a final volume of 20 ng/µL.

### **Quantification of *S. mutans* using qPCR**

For the standard curve, a serial dilution of factor 10 was prepared and 1 µL of DNA of *S. mutans* UA159 was taken five times, in addition to 9 µL of miliQ water. A master mix was prepared for qPCR reaction (10 µL of Mix 2X SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 µL of primer *Smut 3368-F* 25 pmol, 0.5 µL of primer *Smut 3481-R* 25 pmol, 4 µL of miliQ water, and 5 µL of DNA from the samples). 5 µL of miliQ water were used for No Template Controls (NTC).

Each recipient was loaded with 15 µL of master mix plus 5 µL of DNA of *S. mutans*; the measurements were duplicated for controls (NTC), the construction of the standard curve, and the quantification of each sample. Finally, the plaque was covered with optical sealing, according to the manufacturer's instructions.

La amplificación del DNA se realizó en termociclador ECO Real Time (Illumina®, SD, Cal, USA), empleando el siguiente perfil térmico: 95 °C durante 5 min., seguido por 30 ciclos de 95 °C durante 30 seg., 66 °C durante 30 seg., 72 °C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

## RESULTADOS

La muestra estuvo formada por 27 niños de 8 años, cuya salud oral, expresada en índices promedio, fue: índice promedio de higiene oral de Løe Silness = 1,45; COPD = 1,09 y ceop = 2,9, de cuatro sitios (mesial, distal, vestibular y palatino o lingual) de los dientes 1.6, 1.2, 2.4, 3.6, 3.2 y 4.4.(Tabla 3)

Tabla 3. Índices promedio de higiene oral, COPD y ceop, separados por grupo de índice de riesgo cariogénico (alto, moderado y cero).

	IHO	COPD	ceop	N
Alto	1,73	1,09	5	11
Moderado	1,64	0	2,3	10
Cero	1,45	0	0	6
Muestra	1,63	0,48	2,9	27

El DNA genómico de *Streptococcus mutans* UA159 evidenció integridad en gel de agarosa al 1%, como se observa en la figura 1.

DNA amplification was performed in an ECO Real Time thermocycler (Illumina®, SD, Cal, USA), using the following thermal profile: 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 95 °C during 30 sec., 66 °C during 30 sec., 72° C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min.

## RESULTS

The sample in the present study included 27 children of 8 years whose oral health, expressed in averages, was: average Loë Silness oral hygiene index = 1.45; DMFT = 1.09 and deft = 2.9, of four sites (mesial, distal, vestibular and palatal or lingual) of teeth 1.6, 1.2, 2.4, 3.6, 3.2, and 4.4 (Table 3).

Table 3. Average Oral Hygiene Index, DMFT and deft, sorted out in groups per cariogenic risk index (high, moderate, zero).

	OHI	DMFT	deft	N
High	1.73	1.09	5	11
Moderate	1.64	0	2.3	10
Zero	1.45	0	0	6
Sample	1.63	0.48	2.9	27

The genomic DNA of *Streptococcus mutans* UA159 showed integrity in 1% agarose gel as shown in Figure 1.

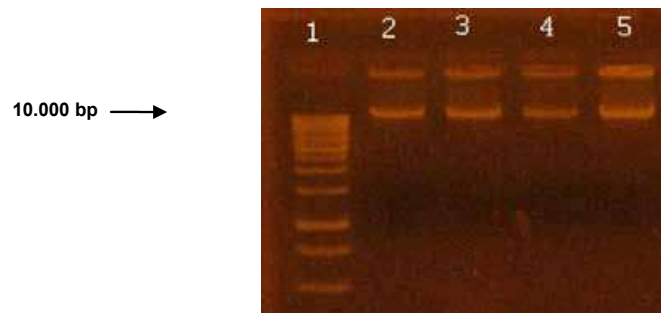


Figura 1. Electroforesis de DNA genómico de *S. mutans* UA159 en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de tamaño molecular de 1 kb. Los carriles 2 a 5 muestran DNA genómico de *S. mutans* UA159.

Figure 1. Electrophoresis of genomic DNA of *S. mutans* UA159 in 1% agarose gel. Lane 1: marker of 1 kb in molecule size. Lanes 2 to 5 show genomic DNA of *S. mutans* UA159.

La utilización de los partidores universales demostró la presencia y amplificación de DNA bacteriano por medio de PCR convencional (a tiempo final) con los partidores universales para *16Sr RNA*.

La utilización de los partidores *Smut 3368-F* y *Smut 3481-R* (Figura 2) evidenció especificidad mediante la obtención de un amplicón del tamaño esperado (114 pb),<sup>20</sup> puesto que dichos partidores sólo fueron detectados en las muestras de DNA de *S. mutans* UA159 y en DNA de saliva y biopelícula dental.

The use of universal primers demonstrated the presence and amplification of bacterial DNA by conventional PCR (end-point) with universal primers for *16Sr RNA*.

The use of *Smut 3368-F* and *Smut 3481-R* primers (Figure 2) showed specificity by obtaining an amplicon of expected size (114 pb),<sup>20</sup> since these primers were only detected in the DNA samples of *S. mutans* UA159 and in DNA from saliva and dental biofilm.

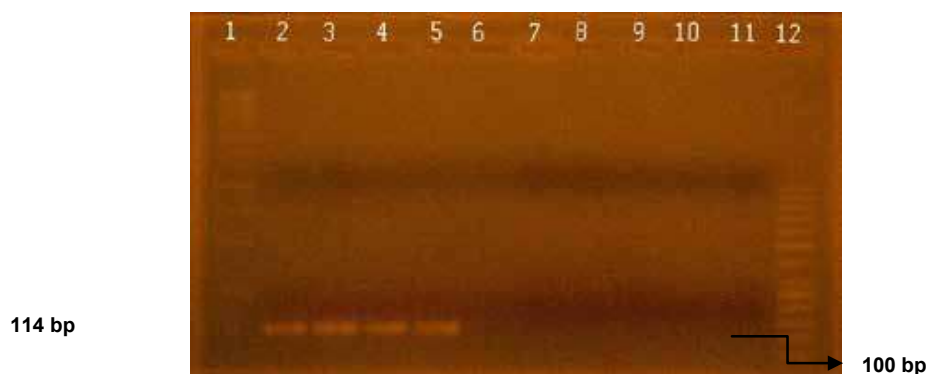


Figura 2. Separación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% de fragmento de 114 bp del gen *gtfB* amplificado mediante PCR. El carril 1 corresponde a estándar de tamaño molecular de 1 kb. Los carriles 2 y 3 corresponden a amplificación empleando DNA de *S. mutans* UA159. Los carriles 4 y 5 corresponden a amplificaciones empleando DNA de muestras de saliva y biopelícula dental (C6 S, C6 PB). Los carriles 6 y 7 corresponden a amplificaciones empleando DNA de *S. sanguinis*. Los carriles 8 al 10 corresponden a amplificaciones empleando DNA de *E. coli*. El carril 11 corresponde a una amplificación empleando agua ultrapura (miliQ). El carril 12 corresponde a un estándar de tamaño molecular de 50 bp.

**Figure 2. Electrophoretic separation of a fragment of 114 bp of gene *gtfB* in 2% agarose gel amplified by means of PCR. Lane 1 corresponds to a standard molecular size of 1 kb. Lanes 2 and 3 correspond to amplification using DNA of *S. mutans* UA159. Lanes 4 and 5 correspond to amplifications using DNA from saliva and dental biofilm samples (S C6, C6 BF). Lanes 6 and 7 correspond to amplifications using DNA of *S. sanguinis*. Lanes 8 to 10 correspond to amplifications using DNA from *E. coli*. Lane 11 corresponds to amplification using ultrapure water (miliQ). Lane 12 corresponds to a standard molecular size of 50 bp.**

La curva estándar se construyó a partir de la dilución del DNA aislado de *S. mutans* UA159, cuya concentración inicial fue de 128 ng/ $\mu$ L (Figura 8). En la curva de fusión (o *melting*) para la amplificación del DNA de *S. mutans* UA159 (Figura 3) se observa un solo pico de amplificación, a una misma temperatura para todas las diluciones. Los duplicados emiten el despegue de fluorescencia logrando la cuantificación de las muestras con un

The standard curve was designed based on the dilution of DNA isolated from *S. mutans* UA159, whose initial concentration was 128 ng/ $\mu$ L (Figure 8). The melting curve for the amplification of DNA of *S. mutans* UA159 (Figure 3) shows a single amplification pick, to the same temperature for all the dilutions. Duplicates issue fluorescence, achieving the quantification of samples with a

delta de 3,36; es decir, entre cada ciclo de amplificación en el que se detecta fluorescencia existe una diferencia de 3,36 ciclos (Figura 4).

delta of 3.36; i.e. between each amplification cycle in which fluorescence is detected there is a difference of 3.36 cycles (Figure 4).

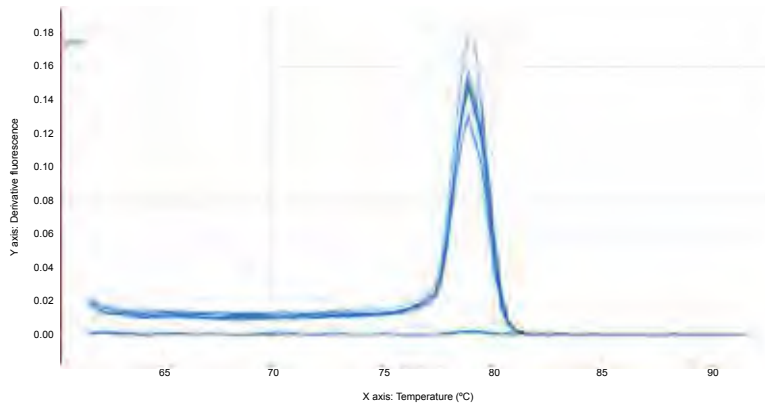


Figura 3. Curva de fusión para un fragmento de 114 bp del gen *gtfB*. Se observa la única temperatura de amplificación de las diluciones seriadas de DNA de *S. mutans* UA159.

Figure 3. Melting curve for a fragment of 114 bp of *gtfB* gene. Note the only amplification temperature of serial dilutions of DNA of *S. mutans* UA159.

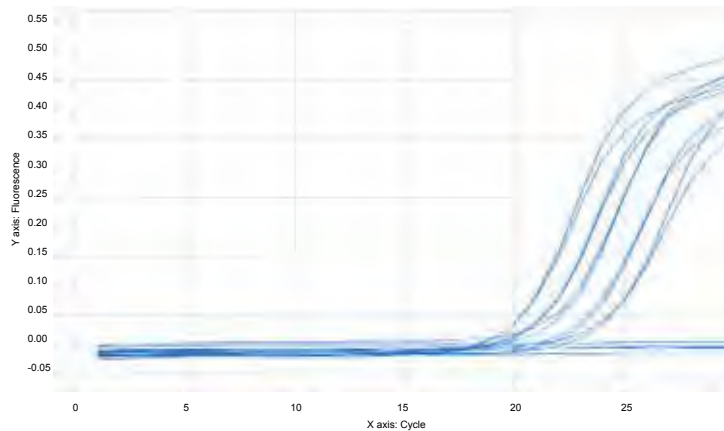


Figura 4. Gráfico de concentración por ciclo de amplificación para un fragmento de 114 bp del gen *gtfB* empleando diluciones seriadas de DNA genómico de *S. mutans* UA159.

Figure 4. Graph of concentration per amplification cycle for a fragment of 114 bp of *gtfB* gene using serial dilutions of genomic DNA of *S. mutans* UA159.

## Cuantificación de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental mediante la técnica qPCR

Después de aislar el DNA total de muestras de los 27 pacientes, se analizó la integridad del DNA de las muestras de saliva y biopelícula purificado. La figura 5 corresponde a un gel representativo del análisis de integridad de DNA extraído de muestras tanto de saliva como de biopelícula dental. La separación electroforética evidencia la presencia de bandas de DNA superiores a 10.000 bp, con integridad en el DNA aislado, acompañado de mínima degradación (Figura 5).

## Quantification of *S. mutans* in saliva and dental biofilm samples by means of qPCR

After isolating the total DNA of samples from the 27 patients came the analysis of DNA integrity of saliva and purified biofilm. Figure 5 corresponds to a representative gel of integrity analysis of DNA extracted from samples of saliva and dental biofilm. The electrophoretic separation showed the presence of DNA bands larger than 10,000 bp, with integrity of the isolated DNA and minimal degradation (Figure 5).

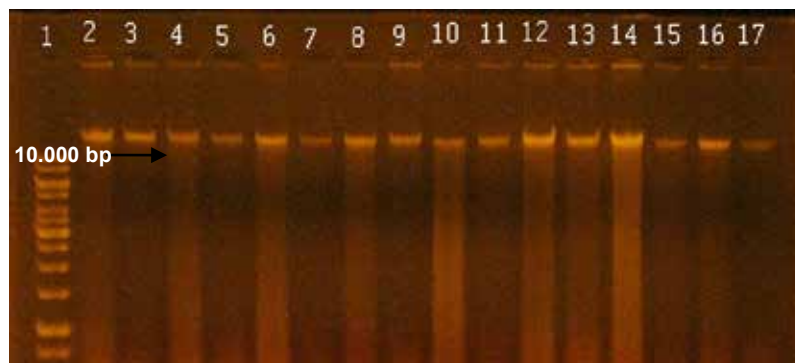


Figura 5. Separación electroforética en gel de agarosa al 1% de DNA genómico de muestras de saliva y biopelícula dental. El carril 1 corresponde al estándar de tamaño molecular de 1 kb. Los carriles 2 al 17 corresponden a DNA de las muestras C1 S (saliva), C1 PB (biopelícula), C2 S (saliva), C2 PB, C3 S, C3 PB, C4 S, C4 PB, C5 S, C5 PB, C6 S, C6 PB, C7 S, C7 PB, C8 S y C8 PB respectivamente.

Figure 5. Electrophoretic separation of genomic DNA from saliva and dental biofilm in 1% agarose gel. Lane 1 corresponds to the standard of molecular size of 1 kb. Lanes 2 to 17 correspond to DNA of samples C1 S (saliva), C1 BF (biofilm), C2 S (saliva), C2 BF, C3 S, C3 BF, C4 S, C4 BF, C5 S, C5 BF, C6 S, C6 BF, C7 S, C7 BF, C8 S and C8 BF, respectively.

Los valores de las concentraciones de DNA total se distribuyeron en el rango de 633 a 25 ng/ $\mu$ L para saliva y 406 a 34 ng/ $\mu$ L para biopelícula dentaria. Para estandarizar las concentraciones iniciales de las muestras antes de la realización del qPCR, los valores obtenidos se diluyeron a una concentración final estandarizada de 20 ng/ $\mu$ L por muestra.

The values of total DNA concentrations were distributed ranging from 633 to 25 ng/ $\mu$ L for saliva and 406 to 34 ng/ $\mu$ L for dental biofilm. To standardize the initial concentrations of samples before conducting qPCR, the obtained values were diluted to a standardized final concentration of 20 ng/ $\mu$ L per sample.

La curva de fusión obtenida en la identificación del gen *gtfB* de *S. mutans* en las muestras de saliva y biopelícula de los 27 pacientes presentó un único pico a una misma temperatura de amplificación para todas las muestras (Figura 6). La amplificación de cada duplicado es similar, logrando una cuantificación de las muestras con un delta entre cada ciclo de 3,36 de diferencia, y una óptima repetitividad de los duplicados (Figura 7).

The melting curve achieved in identifying gene *gtfB* of *S. mutans* in saliva and biofilm samples in the 27 patients showed a single pick at a same amplification temperature for all samples (Figure 6). Amplification of each duplicate is similar, achieving a quantification of samples with a delta of 3.36 in difference between each cycle, and an optimal repeatability of duplicates (Figure 7).

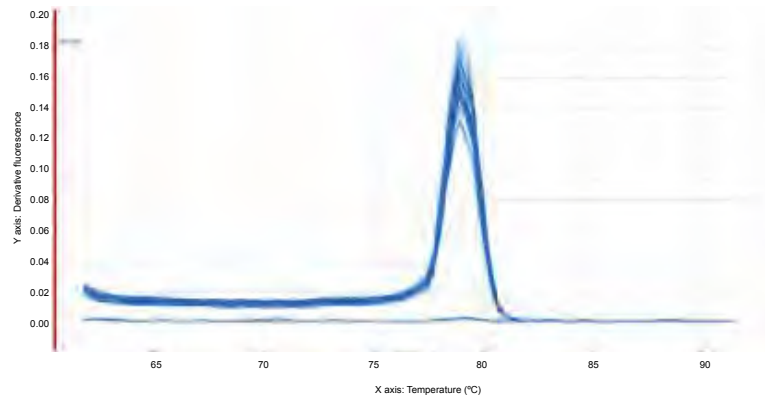


Figura 6. Curva de fusión para amplificación de un fragmento de 114 bp del gen *gtfB* de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental de 27 niños de 8 años de edad.

Figure 6. Melting curve for the amplification of a fragment of 114 bp of the *gtfB* gene of *S. mutans* in saliva and dental biofilm samples from 27 children of 8 years of age.

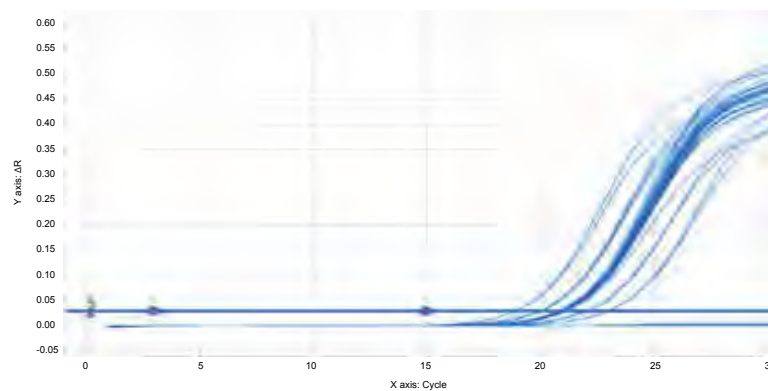


Figura 7. Gráfico de concentración por ciclo de amplificación para un fragmento de 114 bp del gen *gtfB* en muestras de saliva y biopelícula dental de 27 niños de 8 años de edad.

Figure 7. Graph of concentration per amplification cycle for a fragment of 114 bp of *gtfB* gene in saliva and dental biofilm samples from 27 children of 8 years of age.

Los valores obtenidos en la cuantificación del DNA de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental por qPCR se muestran en la tabla 4. Con base en el tamaño del genoma de *S. mutans* se calculó el número de bacterias en mL de saliva y biopelícula dental.<sup>35</sup>

The values obtained by quantifying DNA of *S. mutans* in saliva and dental biofilm samples by qPCR are shown in table 4. The number of bacteria in mL of saliva and dental biofilm was calculated based on the size of the *S. mutans* genome.<sup>35</sup>

Tabla 4. Cuantificación de *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental de niños de 8 años de edad mediante la técnica de qPCR.

Muestra	Concentración de DNA de <i>S. mutans</i> en saliva (ng/ $\mu$ L)	Concentración de DNA de <i>S. mutans</i> en biopelícula dental (ng/ $\mu$ L)	Nº de <i>S. mutans</i> en saliva /mL	Nº de <i>S. mutans</i> en biopelícula dental /mL
C1	5	0,15	1,6x10 <sup>7</sup>	4,89x10 <sup>5</sup>
C4	3,1	4	1x10 <sup>7</sup>	13x10 <sup>6</sup>
C5	0,8	0,9	2,6x10 <sup>6</sup>	2,9x10 <sup>6</sup>
C6	0,12	0,32	3,9x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>
C7	0,4	2,1	1,1x10 <sup>6</sup>	6,8x10 <sup>6</sup>
C8	0,5	0,6	1,6x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>
C9	0,08	0,03	2,6x10 <sup>5</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>
C10	1,62	0,07	5,2x10 <sup>6</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>
C11	0,1	0,14	3,2x10 <sup>5</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>
C12	0,05	0,09	1,6x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>
C13	0,13	0,4	4,2x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>6</sup>
C14	0,14	5,125	4,5x10 <sup>5</sup>	16x10 <sup>7</sup>
C16	0,35	2,4	1,1x10 <sup>6</sup>	7,8x10 <sup>6</sup>
C17	0	0,07	0	2,2x10 <sup>5</sup>
C18	0,02	0,02	6,5x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>4</sup>
C20	0,03	0,03	9,7x10 <sup>4</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>
B26	0,02	0,02	6,5x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>4</sup>
B27	0,02	0,06	6,5x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>5</sup>
B28	0,02	0,03	6,5x10 <sup>4</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>
B29	0,02	0,01	6,5x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>
B21	0,02	0,01	6,5x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>
B25	0	0	0	0
B2	0	0,1	0	3,2x10 <sup>5</sup>
B4	0,01	1,6	3,2x10 <sup>4</sup>	5,2x10 <sup>6</sup>
A7	0	0	0	0
A14	0	0	0	0
A21	0	0,16	0	5,2x10 <sup>5</sup>
$\bar{x}$	0,47	0,71	14,85x10 <sup>5</sup>	74,24x10 <sup>5</sup>



**Table 4.** *Quantification of S. mutans in saliva and dental biofilm samples from 8-year-old children through the qPCR technique.*

Sample	Concentration of DNA of <i>S. mutans</i> in saliva (ng/ $\mu$ L)	Concentration of DNA of <i>S. mutans</i> in dental biofilm (ng/ $\mu$ L)	Number of <i>S. mutans</i> in saliva /mL	Nº of <i>S. mutans</i> in dental biofilm /mL
C1	5	0.15	$1.6 \times 10^7$	$4.89 \times 10^5$
C4	3.1	4	$1 \times 10^7$	$13 \times 10^6$
C5	0.8	0.9	$2.6 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$
C6	0.12	0.32	$3.9 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
C7	0.4	2.1	$1.1 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$
C8	0.5	0.6	$1.6 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$
C9	0.08	0.03	$2.6 \times 10^5$	$9.7 \times 10^4$
C10	1.62	0.07	$5.2 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$
C11	0.1	0.14	$3.2 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$
C12	0.05	0.09	$1.6 \times 10^5$	$2.9 \times 10^5$
C13	0.13	0.4	$4.2 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$
C14	0.14	5.125	$4.5 \times 10^5$	$16 \times 10^7$
C16	0.35	2.4	$1.1 \times 10^6$	$7.8 \times 10^6$
C17	0	0.07	0	$2.2 \times 10^5$
C18	0.02	0.02	$6.5 \times 10^4$	$6.5 \times 10^4$
C20	0.03	0.03	$9.7 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$
B26	0.02	0.02	$6.5 \times 10^4$	$6.5 \times 10^4$
B27	0.02	0.06	$6.5 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5$
B28	0.02	0.03	$6.5 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$
B29	0.02	0.01	$6.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$
B21	0.02	0.01	$6.5 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$
B25	0	0	0	0
B2	0	0.1	0	$3.2 \times 10^5$
B4	0.01	1.6	$3.2 \times 10^4$	$5.2 \times 10^6$
A7	0	0	0	0
A14	0	0	0	0
A21	0	0.16	0	$5.2 \times 10^5$
$\bar{x}$	0.47	0.71	$14.85 \times 10^5$	$74.24 \times 10^5$

La linealidad obtenida para la curva estándar empleada en la cuantificación mediante qPCR (Figura 8) da cuenta de un 98% de eficiencia de la técnica. Por otra parte, el comportamiento de los controles sin templado (NTC) muestra una fluorescencia muy por debajo del umbral mínimo en que fueron cuantificadas las muestras con templado, lo que valida los resultados de cuantificación obtenidos con esta técnica (Figura 9).

The linearity achieved for the standard curve used in quantifying by qPCR (Figure 8) accounts for 98% technique efficiency. On the other hand, the behavior of No Template Controls (NTC) shows fluorescence far below the minimum threshold in which the templated samples were quantified, validating the quantification results obtained with this technique (Figure 9).

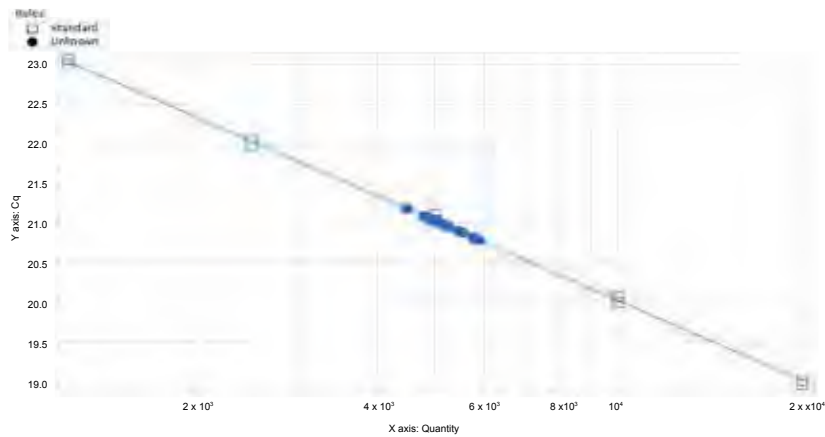


Figura 8. Curva estándar. Gráfica de concentración de DNA a partir del valor *cq* (ciclo de cuantificación) de la muestra desconocida.

Figure 8. Standard curve. Graph of concentration of DNA starting from the value of cycle of quantification (*cq*) of the unknown sample.

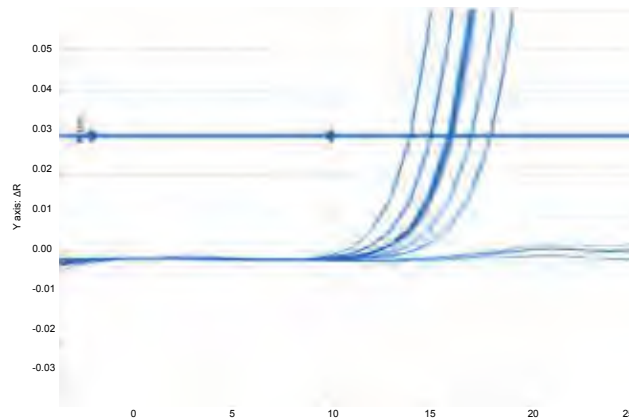


Figura 9. Gráfica de comportamiento de las muestras sin templado (NTC).

Figure 9. Graph of behavior of non-templated samples (NTC).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la amplificación mediante qPCR mostraron un alto porcentaje de eficiencia y un razonable delta entre cada ciclo. El análisis de estos parámetros permite validar los resultados obtenidos, basados en la sensibilidad y exactitud de la técnica, tal como han sido publicados previamente,<sup>24-27</sup> con metodología similar. Por lo tanto, es posible afirmar

## DISCUSSION

The findings yielded by qPCR amplification showed a high percentage of efficiency and a reasonable delta in between cycles. The analysis of these parameters allows validating the results thanks to the sensitivity and accuracy of this technique, as previously published,<sup>24-27</sup> with similar methodology. It is therefore possible to claim

que la metodología presentada identifica y cuantifica la especie *Streptococcus mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental.

Las metodologías tradicionales de identificación y cuantificación microbiana utilizan el método de cultivo en placa para detectar la cantidad o la presencia de *S. mutans*, lo cual implica que las muestras se procesen en forma inmediata y no se puedan almacenar por tiempos muy prolongados, imposibilitando que estas se congelen para su acopio y posterior análisis. Adicionalmente, el método de cultivo presenta limitaciones que afectan la precisión y coherencia en la evaluación de la infección por *S. mutans*. Los cultivos muestran ciertos inconvenientes, como un laborioso y prolongado tiempo de procesamiento microbiológico y un menor nivel de sensibilidad. Estas limitaciones dificultan que los métodos de cultivo tradicionales proporcionen evaluaciones microbianas precisas para la identificación y cuantificación de *S. mutans* que se asocia con la determinación de susceptibilidad de caries para los individuos en situación de riesgo.<sup>37</sup>

Además, existe el inconveniente relacionado con el almacenamiento o preservación de los medios de cultivo, que debe garantizar la viabilidad en el tiempo; se debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable.<sup>38</sup>

El traslado de muestras congeladas es el método preferido para transportar y almacenar grandes colecciones de especies microbianas. Estas condiciones aumentan la complejidad y el riesgo de perder la viabilidad de las células para realizar cuantificación mediante la técnica de cultivo tradicional.<sup>39</sup>

Por otra parte, el PCR convencional, o TF, es una técnica cualitativa que solo permite indicar presencia o ausencia de un determinado fragmento de DNA y por ende asociar la presencia o ausencia de un determinado microorganismo. En cambio, la qPCR es una técnica rápida con la que se pueden obtener resultados cualitativos y cuantitativos con facilidad, y que pueden provenir de muestras almacenadas por tiempos muy prolongados.<sup>40</sup>

that this methodology identifies and quantifies *Streptococcus mutans* spp. in saliva and dental biofilm.

The traditional methods for microbial identification and quantification used the method of cultivation on plaque to detect the presence or quantity of *S. mutans*, which implies processing samples immediately without the possibility of storing them for long periods of times or freezing them for later analysis. In addition, the culture method has limitations that affect accuracy and consistency in evaluating infection by *S. mutans*. Cultures show certain disadvantages, such as extended time for microbiological processing and a lower level of sensitivity. These limitations make it difficult for traditional culture methods to provide accurate microbial evaluations to identify and quantify *S. mutans* associated with caries susceptibility in individuals at risk.<sup>37</sup>

In addition, there is the drawback related to storage or preservation of culture agents, which must ensure viability over time; contamination risks should be minimal ensuring that culture purity remains unaffected.<sup>38</sup>

The transportation of frozen samples is the preferred method for moving and storing large collections of microbial species. These conditions increase complexity as well as the risk of losing the viability of cells for quantification with the traditional culture technique.<sup>39</sup>

On the other hand, conventional PCR is a qualitative technique that only allows indicating the presence or absence of a specific fragment of DNA and therefore associating it with presence or absence of a particular microorganism. Instead, qPCR is a quick technique that easily provides qualitative and quantitative results that can come from samples stored for long periods of time.<sup>40</sup>

La qPCR, a pesar de ser más compleja y utilizar equipos de mayor costo y mayor tecnología que los cultivos tradicionales de dilución en serie, es una técnica que, una vez establecida, resulta de menor costo y de mayor rapidez y precisión.<sup>24</sup> A su vez, estas ventajas permiten reducir el costo de laboratorio cuando este examen es solicitado al paciente como complemento para la determinación del riesgo cariogénico individual. Sin embargo, la determinación de la masa inicial de la muestra (saliva y placa bacteriana colectada) es considerada una etapa indispensable para el establecimiento del recuento bacteriano, hecho que determina una debilidad del presente estudio.

La extracción de DNA realizada a partir de las muestras de saliva y biopelícula mostró cierto nivel de degradación, a diferencia del observado en las muestras de cultivo puro de *S. mutans* UA159. La explicación de este fenómeno se encuentra en la diversidad y abundancia del ecosistema oral. Para la resolución de este fenómeno se utilizó RNAasa, lo que permitió aumentar la integridad de las muestras.

La elección del gen blanco, según Ono y colaboradores,<sup>41</sup> se debe a que se describe al gen *spaP* como el que presenta la mayor sensibilidad para la detección de *S. mutans*. Sin embargo, un reciente estudio de cepas provenientes de la población chilena reporta la presencia del gen *gtfB* en el 100% de las cepas de *S. mutans*,<sup>45</sup> mientras que solo el 63% muestra la presencia del gen *spaP*,<sup>42-44</sup> razón que explica la elección del gen *gtfB* para el presente estudio. Sin embargo, este hecho minimiza, pero no garantiza, los defectos en la detección, debido a la posibilidad de encontrar polimorfismo.

La etiopatogenia de la caries dental se ha vinculado tradicionalmente con los desequilibrios de la biopelícula dentaria;<sup>1, 12</sup> sin embargo, para la definición de riesgo de la enfermedad se utilizan conteos de UFC de *S. mutans* en saliva. Esta dicotomía se basaba en la fácil medición volumétrica de la muestra de saliva, respecto de la dificultad para determinar la cantidad de biopelícula dentaria. Actualmente, con las técnicas moleculares es posible cuantificar dicho riesgo en la biopelícula dentaria; por lo tanto, es

Despite being more complex and requiring costly and more advanced equipment in comparison to the traditional method of cultivation in dilution series, once established, qPCR results in lower cost and greater speed and accuracy.<sup>24</sup> These advantages also allow reducing laboratory costs when patients are requested this test as a complement to determine individual cariogenic risk. However, determining the initial sample mass (collected saliva and bacterial plaque) is an essential stage for establishing bacterial count—a fact that appears as a weakness of the present study—.

The extraction of DNA from saliva and biofilm samples showed some level of degradation, contrasting with the observations in samples of pure culture of *S. mutans* UA159. This phenomenon may be explained by the diversity and abundance of the oral ecosystem. RNAasa was used to overcome this problem, thus increasing the integrity of samples.

According to Ono et al,<sup>41</sup> the white gene is chosen because the *spaP* gene is described as the one with the greatest sensitivity to detect *S. mutans*. However, a recent study on strains in Chilean population reported the presence of the *gtfB* gene in 100% of *S. mutans* strains,<sup>45</sup> while only 63% shows the presence of the *spaP* gene,<sup>42-44</sup> which explains the choice of the *gtfB* gene for this study. However, this fact minimizes, but does not guarantee, detection defects, due to the possibility of finding polymorphism.

The etiology of dental caries has been traditionally linked to imbalances in dental biofilm;<sup>1, 12</sup> however, counts of CFU of *S. mutans* in saliva are used to define disease risk. This dichotomy used to be based on the ease of volumetric measurement of saliva samples compared to the difficulty in determining the amount of dental biofilm. Currently, molecular techniques allow quantifying such risk in dental biofilm; therefore, it is

recomendable obtener muestras de biopelícula, dado que esta constituye el nicho natural de *S. mutans* en la cavidad oral. El presente estudio mostró mayor cantidad de *S. mutans* en biopelícula (media  $74,24 \times 10^5$ ) que en saliva (media  $14,85 \times 10^5$ ), lo que constituye una herramienta de mayor precisión para la identificación y cuantificación de *S. mutans* en biopelícula en la etapa de evaluación del riesgo cariogénico.

Finalmente, la adecuada distribución de las diluciones sobre la curva de estandarización indicó precisión procedimental y metodológica en la construcción de la gráfica (se utilizaron los cinco puntos recomendados), lo cual permitió validar las posteriores cuantificaciones efectuadas para cada una de las muestras. Similar rigurosidad se observó en el comportamiento de la fluorescencia bajo el umbral, al analizar los controles sin template, lo que evidenció la ausencia de contaminaciones externas durante los procesos, así como la inexistencia de dímeros de partidores.

## CONCLUSIONES

La metodología desarrollada permite identificar y cuantificar *S. mutans* en muestras de saliva y biopelícula dental almacenadas en frío, de manera específica, sensible y rápida, utilizando partidores específicos. La técnica de qPCR posibilita un mayor volumen de procesamiento de muestras, lo que permite ahorrar tiempo en la obtención de los resultados.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue posible gracias a fondos otorgados por FONIS-CONICYT Chile al proyecto SA-13i20205.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés directo o indirecto con ninguno de los materiales y equipos utilizados en el presente estudio.

recommended to obtain biofilm samples, since this is the natural niche of *S. mutans* in the oral cavity. The present study showed greater amount of *S. mutans* in biofilm (average  $74.24 \times 10^5$ ) than saliva (average  $14,85 \times 10^5$ ), making it a tool of greater precision for the identification and quantification of *S. mutans* in biofilm during the stage of evaluation of cariogenic risk.

Finally, the appropriate distribution of dilutions on the standardization curve showed the procedural and methodological precision in creating the graph (the five recommended points were used), which allowed validating subsequent quantifications performed for each sample. The same accuracy was observed in the behavior of fluorescence under the threshold in analyzing No Template Controls, demonstrating the absence of external contaminations during the processes, as well as the absence of primer dimers.

## CONCLUSIONS

The used methodology allows identifying and quantifying *S. mutans* in saliva and dental biofilm samples stored in cold, in a specific, sensitive and quick manner, using specific primers. The qPCR technique enables processing a greater volume of samples, which saves time in obtaining results.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was possible thanks to funding provided by FONIS-CONICYT Chile to project SA-13i20205.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare not having any type of direct or indirect conflict of interest with any of the materials and equipment used in the present study.

## CORRESPONDENCIA

Gustavo Moncada, DDS  
Universidad Mayor  
(+56 2) 2328 1710  
gmoncada@adsl.tie.cl  
Alameda Bernardo O'Higgins 2013  
Santiago, Chile

## CORRESPONDING AUTHOR

Gustavo Moncada, DDS  
Universidad Mayor  
(+56 2) 2328 1710  
gmoncada@adsl.tie.cl  
Alameda Bernardo O'Higgins 2013  
Santiago, Chile

## REFERENCIAS / REFERENCES

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369(9555): 51-59
2. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31 Suppl 1: 3-23.
3. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 2005; 83(9): 661-669.
4. Urzua I, Mendoza C, Arteaga O, Rodríguez G, Cabello R, Faleiros S et al. Dental caries prevalence and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. *Int J Dent* 2012; 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/810170>.
5. Marsh P, Martin M, Lewis M, Williams D. *Oral microbiology*. 5 ed. Londres: Churchill Livingstone; 2009.
6. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 2013; 47(6): 591-600.
7. Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res*. 1998; 77(3): 445-452.
8. Rupf S, Merte K, Eschrich K, Kneist S. *Streptococcus sobrinus* in children and its influence on caries activity. *Eur Arch Paediatr Dent* 2006; 7(1): 17-22.
9. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D et al. Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res* 2010; 44(6): 547-554.
10. Liu Y, Dong Y, Chen YY, Burne RA. Environmental and growth phase regulation of the *Streptococcus gordonii* arginine deiminase genes. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(16): 5023-5030.
11. Dong Y, Chen YY, Burne RA. Control of expression of the arginine deiminase operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. *J Bacteriol* 2004; 186(8): 2511-2514.
12. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004; 38(3): 182-191.
13. Nauntofte B, Tenovuo JO, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. En: Fejerskov O, Kidd E (eds). 1 ed. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell; 2003. p. 7-27
14. Fejerskov O. *Different concepts of dental caries and their implications*. 2 ed. Copenhagen: Munksgaard; 1994.
15. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4): 613-630.
16. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 198-202.
17. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3313-3317.
18. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011; 45(1): 69-86.

19. Yano A, Konno N, Imai S, Kato H. Inhibitory effects of polysaccharides on the cariogenic activities of *Streptococcus mutans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(12): 2313-2316.
20. Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci* 2005; 47(2): 59-64.
21. Senneby A, Mejäre I, Sahlin NE, Svensäter G, Rohlin M. Diagnostic accuracy of different caries risk assessment methods. A systematic review. *J Dent* 2015; 43(12): 1385-93.
22. Karjalainen S, Tolvanen M, Pienihäkkinen K, Söderling E, Lagström H, Simell O et al. High sucrose intake at 3 years of age is associated with increased salivary counts of mutans streptococci and lactobacilli, and with increased caries rate from 3 to 16 years of age. *Caries Res* 2015; 49(2): 125-132.
23. Twetman L, Twetman S. Comparison of two chair-side tests for enumeration of Mutans Streptococci in saliva. *Oral Health Dent Manag* 2014; 13(3): 580-583.
24. ChildersNK, OsgoodRC, HsuKL, ManmontriC, MomeniSS, Mahtani HK et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction for enumeration of *Streptococcus mutans* from oral samples. *Eur J Oral Sci* 2011; 119(6): 447-454.
25. Al-Robaiy S, Rupf S, Eschrich K. Rapid competitive PCR using melting curve analysis for DNA quantification. *Biotechniques* 2001; 31(6): 1382-1386, 1388.
26. Rupf S, Merte K, Eschrich K. Quantification of bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. *J Dent Res* 1999; 78(4): 850-856.
27. Rupf S, Merte K, Kneist S, Al-Robaiy S, Eschrich K. Comparison of different techniques of quantitative PCR for determination of *Streptococcus mutans* counts in saliva samples. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(1): 50-53.
28. Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 272(2): 154-162.
29. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27(2-3): 95-125.
30. Sloots TP, Nissen MD, Ginn AN, Iredell JR. Rapid identification of pathogens using molecular techniques. *Pathology* 2015; 47(3): 191-198.
31. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol* 2008; 79(9): 1620-1629.
32. Karsai A, Müller S, Platz S, Hauser MT. Evaluation of a homemade SYBR green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques* 2002; 32(4): 790-792, 794-796.
33. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29(1): 23-39.
34. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distanti V, Pazzagli M et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309(2): 293-300.
35. Taylor SC, Mrkusich EM. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). *J Mol Microbiol Biotechnol* 2014; 24(1): 46-52.
36. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(9): 4438-4441.
37. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 4950-4954.
38. Weng T, Jin N, Liu L. Differentiation between amplicon polymerization and nonspecific products in SYBR green I real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2005; 342(1): 167-169.
39. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* 2006; 66(2): 183-193.
40. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(1): 165-256.
41. Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F, Fukui K. Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of spaP gene. *J Med Microbiol* 1994; 41(4): 231-235.

42. Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42(2): 127-131.
43. Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 2009; 19(2): 141-147.
44. Durán-Contreras GL, Torre-Martínez HH, de la Rosa EI, Hernández RM, de la Garza Ramos M. spaP gene of *Streptococcus mutans* in dental plaque and its relationship with early childhood caries. *Eur J Paediatr Dent* 2011; 12(4): 220-224.
45. Vásquez S, Lobos O, Padilla C. Presencia de genes de virulencia *gtfB* y *spaP* en *Streptococcus mutans* aislados desde saliva y su relación con el índice COPD y ceod. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2014; 7(2): 65-71.