

Identification and characterization of bacteria isolated from oral infection of patients from Bajío

Identificación y caracterización de bacterias aisladas de infecciones bucodentales en pacientes del Bajío

Loyola Alonso Jesús Agustín¹; Valdés Sánchez Ximena¹; Vargas Lara Antonio Ramses¹; Flores Villegas Verónica Abril¹; Hernández Rangel Yazmín Alexandra¹; Díaz Nachez Armando Giovanni¹; González Pérez Alma Rosa¹; Ramírez Zúñiga María de Rosario¹; Martínez Palacios Cruz Eugenia¹; Cardoso Reyes Luis Rafael¹; López Godínez Juana¹; Vásquez Morales Suria Gisela¹; Secundino Velázquez Ismael²; Reyes Martínez Juan Elizabeth¹; Reyes Cortes Ruth¹

¹Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato; Guanajuato capital, 36050.

²Facultad de Odontología, Universidad de La Salle Bajío; Blvd Juan alonso Torres, 3602, León de los Aldama 37458.

reyes.ruth@ugto.mx

Resumen

Las infecciones bucodentales son uno de los problemas de salud pública más constantes alrededor del mundo, con importantes repercusiones económicas. La etiología de las enfermedades como *gingivitis*, *periodontitis*, *mucositis* y *periimplantitis* es multifactorial, ocasionada en su mayoría por géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Enterococcus*, entre otras. Por otra parte, estudios recientes indican la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el microbioma bucal, en los cuales se destacan la resistencia a macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, betalactámicos y estreptogramas. Debido a lo agresivo de los cuadros clínicos, es necesario identificar a los microorganismos causantes de las patologías bucales y sus principales características biológicas para ofrecer opciones de tratamiento eficientes y disminuir la resistencia bacteriana. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar a los microorganismos presentes en pacientes con enfermedades periodontales de la región del Bajío.

Palabras clave: Enfermedad periodontal, microbioma oral, resistencia bacteriana

Abstract

Oral infections are one of the most important public health problems worldwide with economic consequences. The etiology of diseases as *gingivitis*, *periodontitis*, *mucositis* and *peri-implantitis* is multifactorial, mostly caused by genera such as *Streptococcus*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Enterococcus* and others. On the other hand, recent studies indicate the presence of antibiotic resistance genes (ARGs) in the oral microbiome, in which resistance to macrolides, lincosamides, tetracyclines, beta-lactams and streptogramins is common. Due to the aggressiveness of oral disease, it is necessary to identify the microorganisms causing oral pathologies and their main biological characteristics to offer efficient treatment options and reduce bacterial resistance. Therefore, the objective of this study was to identify and characterize the microorganisms present in patients with periodontal diseases from Bajío region.

Keywords: Periodontal diseases, oral microbiome, antimicrobial resistance.

Introducción

La boca o cavidad bucal es una parte del cuerpo que cumple con diversas funciones, como iniciar la digestión y ser parte del proceso de fonación. Además, cuenta con su propio microbioma, el cual participa en la protección contra agentes patógenos evitando su adhesión y produciendo nitritos, que serán incorporados al flujo sanguíneo favoreciendo la formación de óxido nítrico, como primer sistema de defensa [1]. Los organismos que conforman este microbioma, generalmente, varían dependiendo del área demográfica, la dieta, la edad, entre otros factores; no obstante, los géneros que usualmente están presente son *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Eikenella*, *Granulicatella*, *Rothia*, *Porphyromonas*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Treponema*, *Neisseria*, *Capnocytophaga*, *Lactobacterium*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Gamella*, *Staphylococcus*, *Eubacteria* y *Propionibacterium* [1].

A pesar de los beneficios que trae el microbioma bucal, los malos hábitos de higiene llevan a que estas bacterias proliferen exageradamente y dañen los tejidos de las mucosas y las encías. Esto ocasiona que las bacterias comiencen a generar biopelículas (asociación de comunidades bacterianas), provocando una retracción de las encías en forma de bolsa donde también se almacena sarro. Esto es comúnmente llamado *gingivitis* [2]. Posteriormente, los microorganismos se infiltrarán en las bolsas, inflamando los tejidos que con el tiempo desarrollará una destrucción de la zona alveolar y la caída del diente, este cuadro clínico se le conoce como *periodontitis* [2][3]. Este progreso de la enfermedad también sucede en los implantes dentales, inicialmente se lleva un proceso de infiltración de los microorganismos en el periodonto del implante, causando una inflamación reversible con sangrado conocida como *mucositis periimplantaria*, sin embargo, el progreso de esta enfermedad lleva a un estado irreversible con la destrucción ósea del alveolo, este cuadro clínico se llama *peri-implantitis* [4][5].

Las infecciones periodontales se pueden determinar por las manifestaciones clínicas como por los agentes etiológicos que los provocan. La *gingivitis* se caracteriza por una retracción de las encías con un ligero hinchazón, enrojecimiento y sangrado, habitualmente sin dolor [2][6]. Los agentes etiológicos que causan esta enfermedad son los géneros *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella* y *Treponema* [6]. En el caso de *periodontitis*, los síntomas que la componen son: inflamación de los tejidos del periodonto, dolor dental, sangrado, reabsorción en la zona alveolar, y en última instancia, la pérdida del diente [3][4]. Los patógenos que causan la enfermedad son *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Enterococcus* [3][7]. La *mucositis periimplantaria* causa enrojecimiento, hinchazón, sangrado e inflamación reversible, mientras que la *peri-implantitis* además de estos síntomas tienen purulencia, inflamación de los tejidos del periodonto y reabsorción ósea [4][5]. La etiología está compuesta de *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivlis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* y *Enterococcus faecalis* [4][7].

Las consecuencias de padecer una enfermedad periodontal se ven agravadas por los fenómenos de resistencia a antibióticos en el microbioma bucal. En un estudio realizado por Caselli et al., [8], se realizó la identificación de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en muestras pertenecientes a pacientes sanos, resultando en una alta incidencia de genes de resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas y tetraciclinas. Así mismo, un estudio de metagenómica realizado por Kang et al., [9], en una muestra de obtenida de una paciente con enfermedad periodontal, se descubrió ARGs de bacitracina, betalactámicos, macrólidos-lincosamidas, estreptograminas y tetraciclinas, además de genes de resistencia a metales (MRGs).

Por esta razón, en las enfermedades bucodentales es importante la identificación del agente causal, para ofrecer un tratamiento dirigido y evitar utilizar antibióticos que generen el incremento de ARGs en el microbioma bucal. El objetivo de este proyecto fue identificar y caracterizar a los microorganismos presentes en pacientes con enfermedades periodontales de la región del Bajío.

Estrategia experimental

La estrategia experimental para identificar y caracterizar las bacterias de infecciones orales consistió en 3 etapas: 1) Aislamiento y resiembra de cultivos puros, 2) Caracterización bioquímica y 3) Caracterización molecular.

Los medios de cultivos utilizados fueron el medio enriquecido de infusión cerebro y corazón (BHI) en condiciones de microaerofilia a 37°C. Las bacterias aisladas fueron denominadas como Aislado Bucal 01 (AB01), AB02 y AB03, las dos primeras corresponden a un paciente que presentaba *peri-implantitis* y *mucositis*, mientras que la última pertenecía a una enfermedad periodontal no clasificada.

La caracterización bioquímica se centró en definir su morfología individual y de colonia a través de una tinción de Gram. Para la identificación de sus propiedades metabólicas, se realizaron las pruebas de oxidasa, catalasa, hemólisis en agar sangre, hidrólisis de bilis-esculina, fermentación de manitol y movilidad. Estas pruebas fueron ejecutadas mediante técnicas estándar [10] [11] [12].

Las pruebas de susceptibilidad se ejecutaron mediante el método de difusión en disco (Kirby - Bauer) utilizando sensibilizadores Gram positivos de la marca MULTIBAC I.D. Cabe destacar que, en el caso del agente causante de *peri-implantitis* debido a las exigencias de su crecimiento, se utilizó el medio *Cation Adjusted Muller Hinton (CAMH)* ideal para los microorganismos fastidiosos descrito en M07-A9-2012 del CLSI [13]. Estas pruebas fueron realizadas en base a las técnicas estándar del *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)* [14] [15].

La caracterización molecular consistió en la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final y secuenciación de la subunidad ribosomal 16s. La amplificación de esta región se llevó a cabo en reacciones de 50 μ L utilizando los oligos universales *16s-Fw* TTGGAGAGTTTGATCMTGGCTC y *16s-Rv*

GTATTACCGCGGCTGCTG [16] bajo las siguientes condiciones de reacción: Desnaturalización inicial: 95°C/3min; 40 ciclos de desnaturalización: 95°C/30seg; alineamiento: 64°C/30seg; extensión: 72°C/20seg y una extensión final: 72°C/10min. El fragmento de la amplificación (510 pb) fue cortado a partir del gel de agarosa al 1% y purificado mediante columnas comerciales (Thermo Scientific™ Kit de purificación de PCR GeneJET) para su posterior cuantificación y secuenciación. Con los datos obtenidos, se realizó el alineamiento de las secuencias utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [17].

También se amplificaron los genes *gtf-B* y *gtf-B-zu* presentes en *Streptococcus mutans* [18] [19], los genes *ssl1* y *ssl2* característicos de *Streptococcus sanguinis* [20], y los genes *ef1* y *ef2* para la identificación de *Enterococcus faecalis* [21] siguiendo las condiciones reportadas previamente, en un volumen final de reacción de 10 μ L. Estos genes se seleccionaron de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas. El aislamiento de DNA genómico de cada aislados se obtuvo con el procedimiento establecido por Aljanabi y Martínez (1997) [22].

Resultados

Morfología colonial de los aislados bucales

Los resultados mostraron que los aislados bucales son capaces de crecer en condiciones de microaerofilia y aerobiosis. El AB01 y AB02 presentaron la misma morfología colonial, diámetro en un rango de 1 – 2 mm, forma redonda de bordes lisos, color blanco, elevación convexa a plana y consistencia butirosa. Por su parte, el AB03 mostró un diámetro de 1 mm, forma redonda de bordes liso, translúcida, elevación convexa a plana y consistencia butirosa (Figura 1). Los 3 aislados resultaron ser cocos Gram positivos (Figura 2).

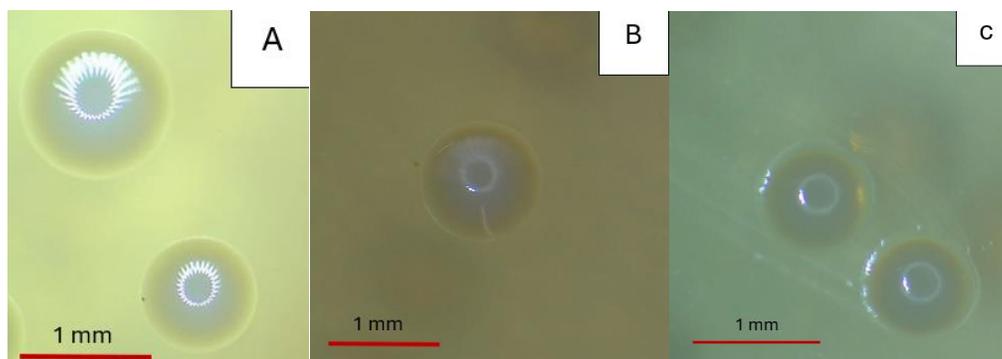


Figura 1. Morfología colonial de los aislados bucales en medio BHI. a) AB01, b) AB02 y c) AB03. Fotografías estereoscópicas 2X.

Características bioquímicas de los aislados bucales

Los resultados de las pruebas bioquímicas (Tabla 1) nos indicaron que los géneros causales de las patologías analizadas pudieran ser microorganismos correspondientes a los géneros *Streptococcus sp* y *Enterococcus sp*. Los cuales son considerados de los principales agentes etiológicos de cuadros de *peri-implantitis* y enfermedades periodontales [3][7].

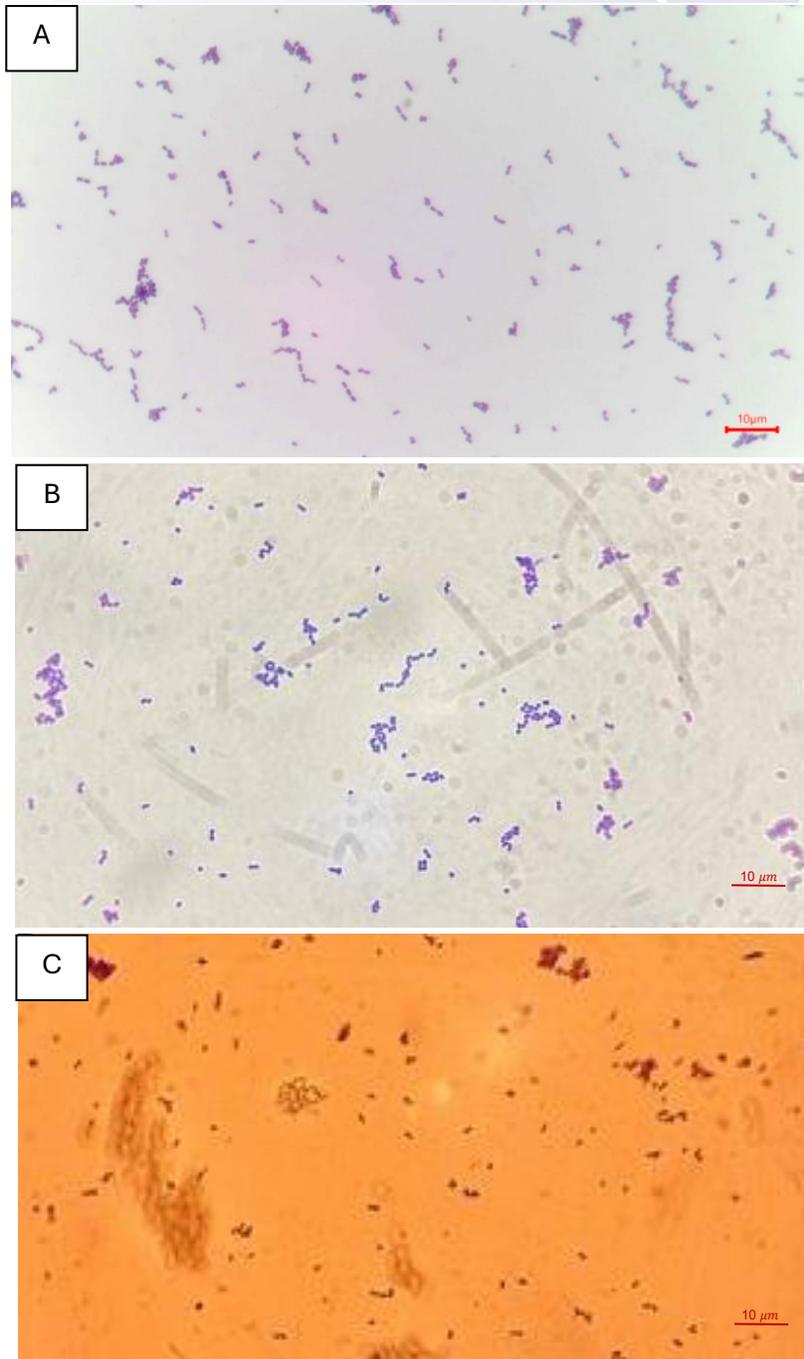


Figura 2. Morfología colonial de los aislados bucales. a) AB01, b) AB02 y c) AB03. Fotografías microscópicas 100X

Tabla 1. Pruebas bioquímicas realizadas en los aislados bucodentales (AB01, AB02, AB03).

Características	AB01	AB02	AB03
Cuadro clínico	<i>Periimplantitis</i>	<i>Mucositis</i>	Cuadro periodontal
Condiciones de crecimiento	Aerobiosis / en CO_2 5% a 37°C	Aerobiosis / en CO_2 5% a 37°C	Aerobiosis / en CO_2 5% a 37°C
Oxidasa	-	-	-
Catalasa	-	-	-
Hemolisis	γ	γ	γ
Manitol	-	-	-
Hidrolisis de esculina	N/C	N/C	+
Gram	+	+	+
Agrupación	Cadena de cocos	Diplococos	Diplococos

Simbología: +, prueba positiva; -, prueba negativa; γ , no hemólisis; N/C, sin crecimiento.

Respecto a la susceptibilidad microbica, el aislado AB01 y AB02 resultaron resistentes a 4 de los 12 de los antibióticos probados, sensibles a 5 y mostraron resistencia intermedia a 3 antibióticos. El aislado AB03, solo mostró resistencia a la Ampicilina, mientras que a los 11 antibióticos restantes fue sensible (Tabla 2).

Tabla 2. Antibiograma de los aislados bucodentales.

Antibióticos	AB01	AB02	AB03
Ampicilina 10 μg	R	R	R
Cefaletina 30 μg	S	S	S
Cefotaxima 30 μg	S	S	S
Ciprofloxacino 5 μg	I	I	S
Clindamicina 30 μg	S	S	S
Dicloxacilina 1 μg	R	R	S
Eritromicina 15 μg	R	R	S
Gentamicina 10 μg	R	R	S
Penicilina 10U	S	S	S
Tetraciclina 30 μg	S	S	S
SXT 25 μg	I	I	S
Vancomicina 30 μg	I	I	S

R, resistente; I, intermedio; S, sensible.

Caracterización molecular de los aislados bucales

Se obtuvo DNA genómico de los aislados a concentraciones de 1013.2 ng/uL, 2343.4 ng/uL y 1128.1 ng/uL para los aislados AB01, AB02 y AB03 respectivamente. La amplificación por PCR punto final de *gtf-B* y *gtf-B-zu* específicos para *S. mutans* y *ss1* y *ss2* para *S. sanguinis* fue negativa para los aislados AB01, AB02, y AB03. La amplificación de *ef1* y *ef2* específicos para *E. faecalis* fue positivo para AB02 y AB03 (Tabla 3).

Tabla 3. Amplificación de genes de *S. mutans* y *S. sanguinis*

Genes	AB01	AB02	AB03
<i>gtf-B</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>gtf-B-zu</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>ss1</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>ss2</i>	Negativo	Negativo	Negativo
<i>ef1</i>	Negativo	Positivo	Positivo
<i>ef2</i>	Negativo	Negativo	Positivo

La amplificación de una región de la subunidad 16s ribosomal correspondió al tamaño de 510 pares de bases para todas las muestras, una imagen representativa del producto obtenido de las muestras AB01 y de *E. coli* ATCC de 24212 utilizada como control positivo se muestran en la Figura 2.

Los datos de secuenciación fueron de buena calidad y el análisis de BLAST de las muestras AB01 y AB02 arrojó un porcentaje de identidad de 99.81% con *Streptococcus salivarius* cepa HNL13. Por otro lado, para el aislado AB03, el análisis de BLAST arrojó un resultado de 99.61% porcentaje de identidad con el microorganismo *Enterococcus faecalis* cepa 1153.

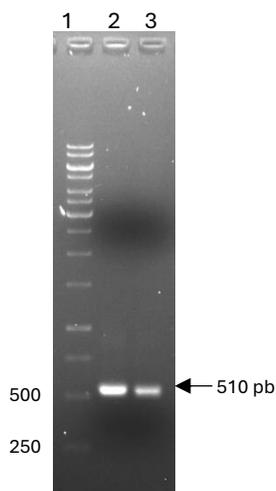


Figura 3. Amplificación de 510 pares de bases de la región codificante de subunidad ribosomal 16S. (1) Marcador de tamaño 1Kb O'GeneRuler, (2) Fragmento de amplificación del aislado AB01 (3) Fragmento de amplificación *E. coli* ATCC 24212. Electroforesis en gel de agarosa 1% 90V/60min.

Discusión

Los resultados mostraron que los aislados AB01 y AB02, provenientes en la muestra del paciente con *peri-implantitis*, corresponden a *Streptococcus salivarius*, mientras que AB03, relacionado con un cuadro periodontal, fue identificado como *Enterococcus faecalis*. Ambas bacterias, presentaron resistencia a múltiples antibióticos, entre ellos los betalactámicos, macrólidos, sulfonamidas y quinolonas de segunda generación.

El aislamiento de *Streptococcus salivarius* como posible agente etiológico de los cuadros clínicos de *periimplantitis* y *mucositis* fue muy interesante, debido a que no se encontró bibliografía que relacionara a esta bacteria comensal como el agente causal de una enfermedad oral. *S. salivarius* se asocia predominantemente a cuadros de bacteriemia, endocarditis y meningitis en pacientes con salud en estado crítico o inmunodeficientes [23]. Este resultado quizá se deba a que la muestra fue tomada de un adulto mayor. Sin embargo, es posible que *S. salivarius* se presente en algún nivel de las biopelículas dentales. Una investigación realizada en la universidad de Rijeka y Osijek, observó que la cepa de *Streptococcus salivarius* K12 podría ser capaz de mantener la homeostasis del microbioma bucal, evitando el desarrollo de bacterias causantes de enfermedades bucodentales, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [24]. Por lo cual, es posible que esta bacteria estuviera presente en conjunto con otro agente causal, que quizás, al tener condiciones de crecimiento más estrictas, no fue posible aislar en esta ocasión.

En el caso de *Enterococcus faecalis*, se trata de una bacteria que sí está relacionada con enfermedades periodontales [7]. La identificación de este agente patógeno es importante debido a los factores de virulencia que posee. Por ejemplo, se ha demostrado que es capaz de generar biopelículas, y también de producir lipasa (92%), hemolisina (28%) y gelatinasa (39%) [7]. Por último, es importante mencionar que recientes estudios, y este mismo trabajo reportan, la selección de resistencia a múltiples antibióticos, como la tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, ampicilina y amoxicilina, el cual es una característica para considerar que determina la elección del tratamiento correcto [7].

Los resultados de la identificación y susceptibilidad a compuestos antimicrobianos es una parte fundamental en la caracterización de agentes etiológicos de la cavidad oral, debido a que permite orientar una terapia dirigida al microorganismo en cuestión, evitando el uso de antibióticos de amplio espectro. Por otra parte, la resistencia de

antimicrobianos es cada vez más frecuente en bacterias patógenas como comensales, por eso mismo es importante orientar el desarrollo de estrategias rápidas y eficientes para la identificación de los organismos causales de infecciones, así como de terapias alternativas de tratamiento, como el uso de péptidos antimicrobianos, probióticos y extractos de plantas, entre otros [25].

Conclusión

Las pruebas bioquímicas y técnicas moleculares permitieron la identificación y caracterización de los microorganismos presentes en pacientes con distintas patologías orales en la región del Bajío. Además, se confirmó la resistencia a antibióticos que presentan. Por lo cual, resulta indispensable estandarizar una estrategia de identificación y caracterización rápida de los patógenos de la cavidad oral con la finalidad de proponer los antibióticos idóneos para el tratamiento de las infecciones bucales así como el estudio de terapias alternativas que permitan disminuir la selección de bacterias resistentes.

Bibliografía

- [1] Mosaddad, S.A., Tahmasebi, E., Yazdani, A. et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38, 2005–2019 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9>
- [2] InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. Overview: Gingivitis and periodontitis. [Updated 2023 Aug 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279593/>
- [3] Larramendi Benítez EM, Remón Santisteban AA. La Periodontitis, un trastorno más allá de las encías. 16 de abril [Internet]. 2021 [fecha de citación]; 60 (281): e995. Disponible en: http://www.rev16deabril.sld.cu/index.php/16_4/articulo/view/995
- [4] Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM. Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review. *Head Face Med*. 2014 Sep 3; 10:34. doi: 10.1186/1746-160X-10-34. PMID: 25185675; PMCID: PMC4164121.
- [5] Martínez Gómez JC, Hernández-Andara A, Quevedo-Piña M, Ortega-Pertuz AI, Lyn Chong M. Periimplantitis: conceptos actuales sobre su etiología, características clínicas e imagenológicas. Una revisión [Peri-implantitis: current concepts about its etiology, clinical and imaging characteristics. A review]. *Rev Cient Odontol (Lima)*. 2023 Dec 26;10(4):e134. Spanish. doi: 10.21142/2523-2754-1004-2022-134. PMID: 38390610; PMCID: PMC10880694.
- [6] Rathee M, Jain P. Gingivitis. [Updated 2023 Mar 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557422/>
- [7] Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, Samaranyake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, Koga-Ito CY. *Enterococcus* species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS One*. 2016 Sep 15;11(9):e0163001. doi: 10.1371/journal.pone.0163001. PMID: 27631785; PMCID: PMC5025163.
- [8] Caselli E, Fabbri C., D'Accolti M., Soffritti I, Bassi C., Mazzacane S., Franchi M. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: The complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020; 20:120. doi: 10.1186/s12866-020-01801-y. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [9] Kang Y., Sun B., Chen Y., Lou Y., Zheng M., Li Z. Dental plaque microbial resistomes of periodontal health and disease and their changes after scaling and root planing therapy. *mSphere*. 2021;6:e0016221. doi: 10.1128/mSphere.00162-21. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- [10] Koneman, E.W. *Diagnostico microbiológico*. 6ª, ed. Editorial Médica Panamericana, 2008. 1383,1387,1413,1420.
- [11] Giovanniello, O. A., Rondinone, S. N., & MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 8-24, 54-91, 306-311
- [12] Leboffe M. J. & Pirce B. E. (2011). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory* (4ta. Ed). Morton Publishing. 61.
- [13] CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- [14] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 34th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024
- [15] ABEL GUTIÉRREZ RAMOS Y/O INVESTIGACIÓN DIAGNOSTICA. (2024). PT-35 *MULTIBAC I.D* [Folleto]. <http://quimex.com.mx/wp-content/uploads/2021/01/Multibac-Multidiscos-Antibiogramas.pdf>
- [16] Kommedal, Ø., Lekang, K., Langeland, N., & Wiker, H. G. (2011). Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis. *Journal of medical microbiology*, 60(Pt 7), 927–936. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028373-0>
- [17] National Center for Biotechnology Information (s.f.) Basic Local Alignment Search Tool <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [18] Valdez, R. M.A; Duque, C.; Calaffa, K.S. Dos Santos, V. R.: Loesch, M.L. A.; Colombo, N. H.; Arthur, R. A; Negrini, T. C.; Boriollo, M. F. G.: Delbem, A. C. B. Genotypic diversity and phenotypic traits of *Streptococcus mutans* isolates and their relation to severity of early childhood caries. (1472-6831)
- [19] Suzuki, N.: Yoshida AFau-Nakano, Y; Nakano, Y. Quantitative analysis of multi-species oral 455 biofilms by TaqMan Real-Time PCR. (1539-4182)
- [20] Li, Y.; Pan, Y.; Qi, F.; Caufield, P. W. Identification of *Streptococcus sanguinis* with a PCR-Generated Species-Specific DNA Probe. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41 (8), 3481-3486. DOI: doi: 10.1128/jcm.41.8.3481-3486.2003.

- [21] Li, J.; Yang, L.; Huang, X.; Wen, Y.; Zhao, Q.; Huang, X.; Xia, J.; Huang, Y.; Cao, S.; Du, S.; et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors of *Enterococcus faecalis* from ducks at slaughterhouses. *Poultry Science* 2022, 101 (4), 101646. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101646>
- [22] Aljanabi, S.M., I. Martínez (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692–4693
- [23] Franco, J. C., Rodríguez, R. L., Sixto, R. A., & Quintela, A. G. (2012). Bacteriemia y celulitis por *Streptococcus salivarius* en un paciente cirrótico. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 105-106. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.11.005>
- [24] Begić, G., Badovinac, I. J., Karleuša, L., Kralik, K., Pelozo, O. C., Kuiš, D., & Gobin, I. (2023). *Streptococcus salivarius* as an Important Factor in Dental Biofilm Homeostasis: Influence on *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Mixed Biofilm. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(8), 7249. <https://doi.org/10.3390/ijms24087249>
- [25] Bessa LJ, Botelho J, Machado V, Alves R, Mendes JJ. Managing Oral Health in the Context of Antimicrobial Resistance. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Dec 8;19(24):16448. doi: 10.3390/ijerph192416448. PMID: 36554332; PMCID: PMC9778414.