

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.06.011

· 综述 ·

低龄儿童龋致龋微生物相关生物标志物的研究进展

韩轩^{1,2}, 霍媛媛^{1,2}, 张琼^{1,2}, 李雨庆¹ 综述; 邹静^{1,2} 审校

1. 口腔疾病研究国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 四川 成都(610041); 2. 四川大学华西口腔医院儿童口腔科, 四川 成都(610041)

【摘要】 健康儿童口腔存在动态平衡的微生物群落环境, 当这种平衡遭到破坏, 部分微生物将转变为致龋微生物并引发低龄儿童龋(Early Childhood Caries, ECC)。致龋微生物在ECC发病过程中发生的改变可作为评估儿童患龋风险及预测ECC发展速度的生物标志物, 对ECC的诊疗意义非凡。就目前研究较多的数种微生物而言, 变异链球菌和与其密切相关的白假丝酵母菌、双歧杆菌属、血链球菌的相关指标有可能作为生物标志物联合判断儿童龋易感性。乳杆菌属的检出率和检出水平可能为判断ECC发展速度提供参考。

【关键词】 低龄儿童龋; 微生物; 生物标志物; 学龄前儿童; 龋病

【中图分类号】 R788.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)06-0391-05

【引用著录格式】 韩轩, 霍媛媛, 张琼, 等. 低龄儿童龋致龋微生物相关生物标志物的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(6): 391-395.

Research progress of microbial biomarkers of early childhood caries HAN Xuan^{1,2}, HUO Yuanyuan^{1,2}, ZHANG Qiong^{1,2}, LI Yuqing¹, ZOU Jing^{1,2}. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pediatric Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZOU Jing, Email: dentistzoujing@163.com, Tel: 0086-28-85503644

【Abstract】 The microorganisms in a healthy child's oral environment survive in certain proportions and form a stable dynamic balance with the host. If this balance is disrupted, some of the microorganisms become cariogenic microbes and cause early childhood caries (ECC). The changes of cariogenic microbes in this process could be used as biomarkers to assess the caries risk of children and forecast the development of ECC. The relative indices of *Streptococcus mutans* and the closely related *Candida albicans*, *Bifidobacterium* and *Streptococci sanguinis* may be used as biomarkers to diagnose the susceptibility of children to caries. The detection rate and detection level of *Lactobacillus* may provide a reference for judging the rate of ECC development.

【Key words】 Early childhood caries; Microorganism; Biomarker; Preschool children; Dental caries

美国儿童牙科学会将低龄儿童龋(Early Childhood Caries, ECC)定义为年龄小于72个月的儿童有1颗及以上乳牙龋坏或因龋造成的牙齿缺失或

充填^[1]。第四次全国口腔健康流行病学调查资料显示, 我国5岁儿童的龋患率为70.9%, ECC已成为最常见的儿童口腔疾病, 严重威胁儿童的身心健康^[2]。

健康人群口腔内的微生物种类约700种, 主要为细菌, 还包含真菌、病毒、支原体和原虫等。这些微生物共同构成联系密切的微生物群落, 并在宿主的口腔环境中形成动态平衡。当平衡被打破, 部分微生物将转变为病原微生物, 引起龋病、

【收稿日期】 2017-12-03; **【修回日期】** 2018-3-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81470035); 国家自然科学基金基金项目(81400502)

【作者简介】 韩轩, 住院医师, 硕士, Email: fove@foxmail.com

【通信作者】 邹静, 教授, 博士, Email: dentistzoujing@163.com

牙周病和黏膜疾病^[3]。学者们就与ECC发生发展相关的致龋微生物做了大量研究,寻找引起平衡破坏的致龋微生物作为生物标志物,为评估儿童龋易感性和预测ECC发展速度提供参考。

1 变异链球菌群

变异链球菌群(*Mutans Streptococci*, MS)是革兰阳性兼性厌氧球菌,是一组表现特征相同的异源性细菌,根据其遗传型和血清型差异分别命名为变异链球菌、大鼠链球菌、远缘链球菌、仓鼠链球菌、野鼠链球菌、猕猴链球菌和道恩链球菌。人类口腔中主要定植变异链球菌和远缘链球菌^[4]。

1.1 流行病学研究

多数研究表明MS与儿童早期患龋显著相关,变异链球菌和远缘链球菌是被认同的重要的致龋微生物,同时携带上述两种细菌的儿童较仅携带其中一种的儿童具有更高的患龋风险^[5]。儿童口腔微环境中变异链球菌基因型越丰富,该菌的致龋能力越强^[6]。多数研究提示ECC与口内MS水平二者有密切联系^[7]。由此可见MS具有作为ECC的生物标志物的潜力。

1.2 致龋机制

MS在婴儿出生后很快即可在口内检出,乳牙萌出后其检出率上升。有研究发现2岁前口内定植MS的儿童较2岁后定植MS的儿童在4岁时具有更高的龋失补牙数(decayed/missing/filled tooth, dmft),提示早期的MS定植会提高儿童的患龋风险^[8]。MS存在垂直传播和水平传播,唾液MS水平较高(>106 CFUs/mL)的母亲更易引发垂直传播^[8]。

MS对牙面具有较强的亲和力,能以蔗糖为底物合成葡聚糖。其中水不溶性葡聚糖可以黏附于牙面的获得性膜或牙釉质表面,介导MS在牙齿表面的蔗糖依赖性黏附,参与牙菌斑生物膜的形成和成熟。MS可发酵多种碳水化合物产酸,变异链球菌和远缘链球菌产酸和耐酸能力较MS其他菌种强,在低pH环境下更具生存优势^[4]。

变异链球菌的表面蛋白P1(protein P1)和葡萄糖基转移酶(glucosyltransferases, GTFs)是研究较多的细菌表面大分子。表面蛋白P1被认为是变异链球菌较为肯定的黏结素,其与唾液蛋白的结合参与了变异链球菌在牙面的非蔗糖依赖性黏附,是重要的毒力分子^[4]。根据表面蛋白P1的蛋白质初级结构可将其分为数个区:信号肽区、A区、P区、V区和C末端,有研究表明A区和C末端在介导黏附过

程中作用明显,但其机制尚不明确^[9]。Sanui等^[10]对其在不同龋易感性儿童口内的表达情况进行了分析,表面蛋白P1的表达随龋病严重程度增加有下降趋势。GTFs是一组变异链球菌可自身合成的复杂酶系统,至少含有3种基因编码(gtfB, gtfC, gtfD),具有为细菌供能和促进变异链球菌蔗糖依赖性黏附的作用^[4]。Terao等^[11]的研究提示gtfC和gtfB在黏附过程中起重要作用,其具体机制还有待进一步探索。

变异链球菌与一些其他的细菌有一定的协同和拮抗作用。儿童菌斑中变异链球菌的存在可提高白假丝酵母菌的定植量,唾液乳杆菌可抑制变异链球菌的定植和菌斑生物膜的形成^[12]。

由以上研究可以推断变异链球菌和远缘链球菌与ECC的发生发展高度相关,其基因型丰富度和所占菌群比例与龋易感性相关性较高。表面蛋白P1在ECC的发生阶段作用较明显,随龋病的程度加重作用降低。GTFs的活性与ECC发展和儿童龋风险高低明显相关。

2 乳杆菌属

乳杆菌属(*Lactobacillus*)是革兰阳性兼性厌氧或专性厌氧杆菌,口腔内乳杆菌种类较多,主要菌株包含嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、短乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌^[4]。

2.1 流行病学研究

学龄前儿童菌斑中最常检测到的乳杆菌属细菌为唾液乳杆菌、发酵乳杆菌和加氏乳杆菌,dmft指数与它们的定植水平呈正相关^[13]。ECC儿童与无龋儿童口内乳杆菌检出率差异很大。邢向辉等^[14]对203名3~5岁儿童口内细菌进行了研究,龋活跃儿童唾液和菌斑中乳杆菌属的检出率和检出水平均明显高于无龋儿童和龋不活跃儿童。另有研究表明,乳杆菌属在患龋牙面菌斑中菌群占比相对于健康部位明显升高^[15]。由此可见乳杆菌与ECC有密切联系,可能能够作为生物标志物。

2.2 致龋机制

新生儿口内没有乳杆菌定植,3个月左右才能检出该菌,是婴儿口腔的正常菌群,乳杆菌属可定植在口腔的各个部位,但数量较少^[4]。

乳杆菌属能发酵多种糖类产酸且耐酸能力强,但黏附能力低,不能黏附到牙齿表面,牙菌斑生物膜中的数量也较少。乳杆菌属具有特异性黏附胶原的能力,pH越低黏附能力越强。故牙体组

织破坏,胶原暴露有利于其大量黏附^[4]。乳杆菌属可合成水不溶性多糖促进其他细菌的黏附和聚集,其产生的生物酸可使菌斑生物膜的pH下降从而促进耐酸菌的增殖^[7]。Lin等^[16]在体外实验中发现干酪乳杆菌、植物乳杆菌和副干酪乳杆菌能降低儿童口内MS、链球菌属的水平,也有研究提出长期服用乳杆菌制品可降低儿童的患龋风险^[17]。

由上述研究可见乳杆菌属在ECC的发展中起重要作用,其检出率和检出水平可能为判断ECC发展速度提供参考。此外部分乳杆菌如干酪乳杆菌、植物乳杆菌和副干酪乳杆菌可能具有防龋效果,发酵乳杆菌和加式乳杆菌也常用于制作发酵食品,如酸奶或乳酸饮料等^[18],故乳杆菌属作为生物标志物用以评判ECC的发展速度需综合考虑菌种类型和儿童的饮食因素。

3 放线菌属

放线菌属(*Actinomyces*)是革兰阳性兼性厌氧丝状菌,主要定植于牙面,是口腔固有菌群的主要成员。口腔中的放线菌属成员主要有黏性放线菌、内氏放线菌、龋齿放线菌、衣氏放线菌、戈式放线菌和迈氏放线菌^[4]。

3.1 流行病学研究

放线菌属与根面龋的相关性研究较多,与ECC相关性研究较少^[19]。Jiang等^[20]对40名3~6岁儿童菌斑的研究发现放线菌属在重症低龄儿童龋(severe early childhood caries, S-ECC)儿童菌斑中相对于无龋儿童表现出数量的极大增长。杨燃等^[21]对40名3~5岁儿童菌斑进行了研究,发现内氏放线菌、戈式放线菌和龋齿放线菌在无龋儿童口腔的检出率高于龋敏感儿童,衣氏放线菌和黏性放线菌的检出率差别不大。Tang等^[22]对53名3~4岁儿童菌斑中放线菌属组成进行了研究,戈式放线菌在ECC儿童菌斑中检出率高于无龋儿童。Jiang等^[23]对40名3~4岁儿童唾液菌群进行了研究,发现ECC儿童唾液中内氏放线菌的水平高于健康儿童。

3.2 致龋机制

3个月的婴儿口腔即可检出龋齿放线菌,随着乳牙的萌出其检出率明显增加。幼儿口腔内以内氏放线菌占优势,黏性放线菌的水平随年龄递增^[4]。

放线菌能发酵多种碳水化合物产酸,黏性放线菌、衣氏放线菌和龋齿放线菌对牙面和胶原有很高的亲和力,能够在根面进行黏附。黏性放线

菌常作为牙菌斑生物膜中细菌黏附的支架加速牙菌斑生物膜的形成。放线菌属细胞表面的菌毛Ⅰ能促进黏性放线菌对唾液包被的羟磷灰石的黏附,菌毛Ⅱ介导放线菌属对变异链球菌、血链球菌、韦荣菌等的集聚^[4]。

以上研究可以看出学者们对于放线菌属的观点尚有争议,其作为判断儿童龋风险的生物标志物敏感性有限。

4 白假丝酵母菌

白假丝酵母菌(*Candida albicans*)是革兰阳性真菌,是口腔中常见的机会致病菌。它是一种多相微生物,在不同的温度和pH值下可有不同的生长方式。酵母相与机体呈共生状态并不致病,当平衡破坏后转变为菌丝相,可导致口腔黏膜感染^[4]。

4.1 流行病学研究

尽管细菌被认为是ECC的主要病原体,一些研究指出白假丝酵母菌也与ECC的发病明显相关。Lozano等^[24]发现患龋儿童唾液中携带的白假丝酵母菌高于无龋儿童。Yang等^[25]发现白假丝酵母菌在ECC儿童菌斑中检出率较高,而在无龋儿童菌斑中极少检出。Ollila等^[26]对183名儿童进行了6年的追踪调查发现早期的白假丝酵母菌定植与乳磨牙患龋密切相关。也有少数研究提出对白假丝酵母菌与ECC相关性提出了质疑,二者间的具体联系还有待更深入的研究^[27]。

4.2 致龋机制

白假丝酵母菌存在于健康人的上呼吸道、肠道和阴道中,在健康人群口腔中检出率可达30%~35%,在新生儿的口腔中亦有较高的检出率^[4]。

白假丝酵母菌可发酵多种糖类产酸,喜酸恶碱,可使生长环境pH低至3.0,耐酸能力极强。对牙面获得性膜和胶原有较高的亲和力,唾液蛋白也可促进其对牙面的黏附,此外它对口腔其他不同组织均有较强的黏附力^[4]。Falsett等^[28]用高糖饮食喂养小鼠以模拟儿童急性龋,发现变异链球菌与白假丝酵母菌之间的相互作用可促进龋坏的发生和发展。

由以上研究可见白假丝酵母菌与ECC有相关性,它可协同变异链球菌共同作为生物标志物评估患儿龋易感性和龋发展速度,提高结果的准确性。

5 其他致龋菌

双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)是一群多形态无

动力的革兰阳性厌氧杆菌,可发酵碳水化合物产酸,因其具有的多种有益功能而受到广泛关注,并添加在乳制品中^[4]。该菌在口腔的分布还不完全清楚。Mantzourani等^[29]未在无龋儿童牙面检出双歧杆菌,在龋坏组织中检出。Valdez等^[30]的研究显示双歧杆菌与变异链球菌一起培养两者均有明显的增殖,其中动物双歧杆菌和长双歧杆菌有耐酸和引起酸化的作用,当这两种双歧杆菌与变异链球菌共同生长时会引起釉质的脱矿。de Matos等^[31]的研究提示无论在悬浮状态还是生物膜状态,变异链球菌与双歧杆菌联合培养相较于变异链球菌单独培养产酸能力明显增强。此外,Jasberg等^[32]在体外菌斑模型中观察到双歧杆菌的存在并未影响变异链球菌的数量。由此可见双歧杆菌与ECC有一定的相关性且对变异链球菌的产酸能力有促进作用。

血链球菌(*Streptococci sanguinis*)是革兰阳性兼性厌氧菌,能发酵多种糖类产酸,因其抑制一些牙周可疑菌生长的作用而被认为是牙周健康的有益菌。血链球菌对获得性膜有很高的亲和力,是牙菌斑生物膜的初始定植菌之一,可加快MS在牙齿表面的黏附和定植,且其合成的对氨基苯甲酸对变异链球菌的生长有促进作用。在MS定植在牙齿表面后,因其产生的变链素可抑制血链球菌的生长,使牙菌斑生物膜由以血链球菌为主的非致龋菌斑变为以MS为主的致龋性菌斑^[4]。Mitrakul等^[33]对140名2~6岁儿童菌斑进行分析,发现变异链球菌与远缘链球菌之和与血链球菌水平的比值与ECC儿童dmft指数呈正相关。

Scardovia Wiggsiae (*S. wiggsiae*)是革兰阳性厌氧杆菌,具有产酸和耐酸的能力,其致龋机制尚不完全清楚,但其与ECC的相关性已得到部分学者的证实^[34]。Tanner等^[35]发现儿童菌斑中是否有*S. wiggsiae*和变异链球菌同时检出与S-ECC显著相关。Vacharaksa等^[36]检测了不同龋易感性的60名2~6岁儿童的菌斑和龋坏组织,发现龋坏组织中*S. wiggsiae*和变异链球菌的检出水平高于菌斑,且同时检出两种细菌的儿童具有更高的患龋风险。

月形单胞菌(*Selenomonas*)是革兰阴性厌氧菌,可发酵糖类产酸。与ECC相关的研究较少。Luo等^[37]发现月形单胞菌仅在健康儿童唾液中有检出,但覆盖样本数小于20%。Jiang等^[20]发现月形单胞菌是S-ECC儿童菌斑中的优势菌之一。有关该菌的研究尚不十分透彻,其与ECC之间的关联

有限。

6 总结和展望

ECC病因复杂,涉及的致龋微生物众多。就目前研究较多的数种微生物而言,变异链球菌和与其密切相关的白假丝酵母菌、双歧杆菌、血链球菌的相关指标可能作为生物标志物联合判断儿童的龋易感性。乳杆菌属的检出率和检出水平可能为判断ECC发展速度提供参考。*S. wiggsiae*也与变异链球菌有一定的相关性,但其机制还有待进一步研究。

致龋微生物相关指标变化复杂多样,难以找到某一个敏感性极高的生物标志物。但多个生物标志物联合使用以增加敏感性和准确性是可行的,构建预测模型综合多个致龋微生物相关指标可能得出误差更小的判断。

参考文献

- [1] American Academy of Pediatric Dentistry, American Academy of Pediatrics, American Academy of Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs. Policy on early childhood caries (ECC): classifications, Consequences, and preventive strategies[J]. *Pediatr Dent*, 2011, 27(7 Suppl): 31-33.
- [2] 白剑峰. 第四次全国口腔健康流行病学调查结果发布:我国儿童龋病流行处于低水平[N]. 人民日报, 2017-09-20(04).
- [3] Teng F, Yang F, Huang S, et al. Prediction of early childhood caries via spatial-temporal variations of oral microbiota[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(3): 296-306.
- [4] 周学东. 实用口腔微生物学与技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 154-273.
- [5] Sarathong P, Pattanaporn K, Chen Z, et al. Streptococcus mutans and streptococcus sobrinus colonization and caries experience in 3 - and 5-year-old Thai children[J]. *Clin Oral Investig*, 2015, 19(8): 1955-1964.
- [6] 刘兴容, 李静. 不同龋敏感儿童口腔变异链球菌不同基因型临床分离株产酸力的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(04): 404-407.
- [7] Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, et al. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment[J]. *Int J Oral Sci*, 2017, 9(11): 185-192.
- [8] Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission [J]. *Pediatr Dent*, 2006, 28(2): 106-109; discussion 192-198.
- [9] Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Amano A, et al. Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in Streptococcus mutans[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2008, 23(4): 265-270.
- [10] Sanui T, Gregory RL. Analysis of streptococcus mutans biofilm proteins recognized by salivary immunoglobulin a[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2009, 24(5): 361-368.

- [11] Terao Y, Isoda R, Murakami J, et al. Molecular and biological characterization of gtf regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2009, 24(3): 211-217.
- [12] Krzyściak W, Kościelniak D, Papież M, et al. Effect of a *Lactobacillus salivarius* probiotic on a double-species *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* caries biofilm[J]. *Nutrients*, 2017, 9(11): 1242.
- [13] Shimada A, Noda M, Matoba Y, et al. Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children[J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2015, 34(2): 29-36.
- [14] 邢向辉, 郭皓, 李治邦, 等. 基于唾液 *S. mutans*、*S. sobrinus* 定量值的儿童龋病 Logistic 预测模型研究[J]. *临床口腔医学杂志*, 2011, 27(1): 17-20.
- [15] Ling Z, Kong J, Jia P, et al. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing[J]. *Microb Ecol*, 2010, 60(3): 677-690.
- [16] Lin X, Chen X, Tu Y, et al. Effect of probiotic *Lactobacilli* on the growth of *Streptococcus mutans* and multispecies biofilms isolated from children with active caries[J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 4175-4181.
- [17] Kaye EK. Daily intake of probiotic *Lactobacilli* may reduce caries risk in young children[J]. *J Evid Based Dent Pract*, 2017, 17(3): 284-286.
- [18] Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV, et al. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: a randomized controlled trial[J]. *Pharmacol Res*, 2012, 65(2): 231-238.
- [19] Dame-Teixeira N, Parolo CC, Maltz M, et al. *Actinomyces* spp. gene expression in root caries lesions[J]. *J Oral Microbiol*, 2016, 8(1): 32383.
- [20] Jiang W, Zhang J, Chen H. Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries[J]. *Curr Microbiol*, 2013, 67(5): 537-542.
- [21] 杨燃, 邹静, 李继遥. 儿童口腔放线菌与儿童龋的关系初探[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(6): 568-570.
- [22] Tang G, Yip HK, Samaranayake LP, et al. *Actinomyces* spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries[J]. *Caries Res*, 2003, 37(5): 381-390.
- [23] Jiang S, Gao X, Jin L, et al. Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 1978.
- [24] Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, et al. Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status[J]. *Acta Odontol Scand*, 2017, 75(1): 30-35.
- [25] Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, et al. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries[J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(8): 1048-1053.
- [26] Ollila PS, Larmas MA. Long-term predictive value of salivary microbial diagnostic tests in children[J]. *Eur Arch Paediatr Dent*, 2008, 9(1): 25-30.
- [27] Gao X, Jiang S, Koh D, et al. Salivary biomarkers for dental caries[J]. *Periodontol*, 2016, 70(1): 128-141.
- [28] Falsetta ML, Klein ML, Colonne PM, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(5): 1968-1981.
- [29] Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HN, et al. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults[J]. *Caries Res*, 2009, 43(4): 308-313.
- [30] Valdez RM, Dos Santos VR, Caiaffa KS, et al. Comparative in vitro investigation of the cariogenic potential of bifidobacteria[J]. *Arch Oral Biol*, 2016, 71: 97-103.
- [31] de Matos BM, Brighenti FL, Do T, et al. Acidogenicity of dual-species biofilms of bifidobacteria and *Streptococcus mutans*[J]. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(5): 1769-1776.
- [32] Jäsberg H, Söderling E, Endo A, et al. Bifidobacteria inhibit the growth of *Porphyromonas gingivalis* but not of *Streptococcus mutans* in an in vitro biofilm model[J]. *Eur J Oral Sci*, 2016, 124(3): 251-258.
- [33] Mitrakul K, Vongsawan K, Sriutai A, et al. Association between *S. mutans* and *S. sanguinis* in severe early childhood caries and caries-free children: a quantitative real-time PCR analysis[J]. *J Clin Pediatr Dent*, 2016, 40(4): 281-289.
- [34] Tanner AR. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens[J]. *J Oral Biosci*, 2015, 57(1): 18-26.
- [35] Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1464-1474.
- [36] Vacharaksa A, Suvansopee P, Opaswanich N, et al. PCR detection of *Scardovia wiggsiae* in combination with *Streptococcus mutans* for early childhood caries-risk prediction[J]. *Eur J Oral Sci*, 2015, 123(5): 312-318.
- [37] Luo AH, Yang DQ, Xin BC, et al. Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition[J]. *Oral Dis*, 2012, 18(6): 595-601.

(编辑 罗燕鸿, 钱虹)