

Realtime PCR법에 의한 청소년의 치아우식 유발세균 감염률 조사

문예림¹, 박지현², 조자원³, 김우람³

¹단국대학교 보건복지대학원 구강보건학과, ²강릉영동대학교 치위생과, ³단국대학교 치과대학 예방치과

Determination of the infection rate of dental caries-causing bacteria in adolescents by a real-time PCR test method

Ye-Rim Mun¹, Ji-Hyeon Park², Ja-Won Cho³, Woo-Ram Kim³

¹Department of Oral Health, Graduate School of Public Health and Social Welfare, Dankook University, Cheonan, ²Department of Dental Hygiene, Gangneung Yeongdong University, Gangneung, ³Department of Preventive Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korea

Received: May 24, 2020

Revised: June 3, 2020

Accepted: June 5, 2020

Corresponding Author: Woo-Ram Kim
Department of Preventive Dentistry,
College of Dentistry, Dankook University,
119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan
31116, Korea
Tel: +82-41-550-1953
Fax: +82-41-553-6582
E-mail: kimwooram1985@gmail.com
https://orcid.org/0000-0001-6277-8393

Objectives: The aim of this study was to investigate the infection rates of bacteria associated with dental caries among children and adolescents in Korea.

Methods: Oral examinations were conducted in 146 students. The numbers of bacteria associated with dental caries, such as *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus casei*, in the subjects' oral cavity were counted by real-time PCR, and infection rates for those bacteria were additionally investigated.

Results: The infection rate of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus casei* was 99.3% (145/146), 63.0% (92/146), 1.4% (2/146), and 25.3% (37/146), respectively. The amounts of *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* did not differ with the participants' age. However, the number of *Streptococcus mutans* was 537.6 for primary school students, 5698.2 for middle school students, and 19037.5 for high school students. The mean number of oral bacteria increased with age ($P<0.05$). The mean bacterial numbers of the infected subjects indicated significant differences in the numbers of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* ($P<0.05$).

Conclusions: The infection rates of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus mutans* were distinct in children and adolescents. Efforts to control the bacteria associated with dental caries are needed to prevent dental caries.

Key Words: Infection rate, Oral microorganism, *Streptococcus mutans*

서 론

청소년기는 아동기에서 성인기에 이르는 과도기이며, 사춘기와 더불어 신체적, 정서적, 사회적으로 큰 변화가 이루어지는 시기이다¹⁾. 따라서 구강건강을 유지, 증진시키기 위해서는 구강보건 교육시 주의와 관심이 지식으로 이어질 수 있도록 하고, 태도 변화로 이행될 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다고 보고된 바 있다²⁾. 그러나 대부분의 청소년들은 구강건강 관리에 관심이 적고, 특히 이 시기는 치아우식에 쉽게 이환되며 치은염이 시작되는 시기로 매우 중요하다.

치아우식은 구강 내에 가장 흔한 감염성 질환으로써 치면 위에 세균의 의해 형성된 세균막, 즉 치태가 쌓여 발생하는 질환이며³⁾, 복잡한 구강 내에서 구강병이 발생하려면 여러 가지 원인요소가 상호작용되어야 한다.

치아우식이 발생하는 데 작용하는 요인으로 숙주요인은 치아의 위

년들은 구강건강 관리에 관심이 적고, 특히 이 시기는 치아우식에 쉽게 이환되며 치은염이 시작되는 시기로 매우 중요하다.

치, 형태, 성분, 종류와 구강 외 질병, 임신, 유전적 요인과 타액의 양과 성분, 타액의 점도, 수소이온농도지수(pH)와 완충능력을 포함한다. 병원체 요인으로는 구강 내 산생성균의 종류와 특성 및 양과 활동성, 환경 요인으로는 구강 위생 상태와 구강 위생 관리능력과 식이상태가 포함되고 이러한 숙주 요인, 병원체 요인, 환경 요인의 3가지 요인이 합쳐지는 곳에서 치아우식이 발생되며, Dr. Keye는 이에 시간요인을 추가하여, 어느 정도 시간이 경과하여야만 치아우식이 발생한다고 주장한 바 있다⁴⁾.

이러한 원인 중 병원체 요인인 구강 내 산생성균에 관하여 치아 우식활성검사를 활용하여 향후 치아우식 발생 여부를 예측하고자 하는 노력이 있어 왔으며, Crossner, Zickert, Bretz 등은 타액 내 치아 우식 활성검사를 이용하여 우식발생정도를 예측할 수 있다고 보고하였으나⁵⁻⁷⁾, Tukia-Kulmala와 Tenovu는 타액의 분비량, 완충력, *Lactobacilli*와 *Streptococcus mutans* 수를 측정한 결과에 따르면 개인차에 의하여 치아우식증을 예측하기 위한 목적으로서 효과가 크지 않다⁸⁾고 보고된 바 있다. 그러나 최근에는 구강 세포 내에 발현된 세균들의 정성적인(qualitative) 분석뿐만 아니라 정량적인(quantitative) 분석에 Realtime-PCR법이 이용되고 있으며, 이를 통해 구강 내 치면 세균막이나 타액으로부터 직접 세균을 검출할 수 있게 되어 치아우식 원인균에 대한 다양한 연구가 많이 이루어 지고 있다⁹⁻¹²⁾.

이에 이번 연구 목적은 유전자 발현의 분석 일환으로 Realtime-PCR 기법을 이용하여 일부 청소년 연령의 치아우식유발세균의 감염률을 측정하여, 향후 치아우식활성검사에서 기존의 배양법에 의한 치아우식유발 산생성세균검사를 대체할 수 있는 유전자검사법에 의한 구강내 치아우식유발세균 검사의 기초자료로 이용하고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

이번 연구의 대상자는 2016년 8월부터 2016년 10월까지 연구 참여에 동의한 자 중 남자 72명, 여자 74명 총 146명을 대상으로 하였으

며 D대학교 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)로부터 심의 승인을 받아 연구를 실시하였다(D** 2016-08-004).

대상자를 각각 만 8세부터 11세의 초등학교, 만 12세부터 14세의 중학생, 만 15세부터 17세의 고등학생으로 분류하였다(Table 1).

2. 연구방법

이번 연구에서는 연구에 참여하고자 동의한 만 8세 이상 17세 이하를 대상으로 타액(Saliva)을 채취하여 구강병원성 미생물 DNA 정량 분석(Real-time PCR)을 시행하였다.

2.1. 구강미생물검사

구강미생물의 정량분석을 위하여 realtime PCR법을 이용하여 RNA분석을 하는 Easyperio 검사법(YD Life Science Co., Seongnam, Korea)을 이용하였다. Easyperio 검사법은 약 30초간 가글링을 한 용액을 Easy perio kit에 채득하여 분석 의뢰하여 각 미생물의 양을 확인하였다.

2.2. 자료 분석

연구 자료는 Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)과 IBM SPSS 23.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하여 대상자의 각각 구강미생물의 수를 분석하였으며, 이때 세균 수를 로그지수로 변환하여 양을 분석하였다. 초등학교, 중학생, 고등학생 간의 세균별 미생물수의 비교는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 시행하였으며, 전체 대상자를 대상으로 세균별 상관분석을 실시하였다.

연구 성적

1. 구강미생물 감염률

구강미생물 감염률은 총 146명 중 *Streptococcus mitis*는 99.3% (145명)로 나타났으며, *Streptococcus mutans*는 63.0% (92명),

Table 1. Number of subjects by age and gender

Age group	Age (years)	Total	Male	Female
Total		146	72	74
Primary school students	All	21	12	9
	8	3	3	0
	9	5	2	3
	10	1	0	1
	11	12	7	5
Middle school students	All	68	43	25
	12	19	12	7
	13	27	17	10
	14	22	14	8
High school students	All	57	17	40
	15	16	6	10
	16	29	6	23
	17	12	5	7

Table 2. Prevalence rate of oral microbes

Age group	N	<i>S. mitis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>L. casei</i>
Total	146	99.3% (145)	63.0% (92)	1.4% (2)	25.3% (37)
Primary school students	21	100.0% (21)	42.9% (9)	4.8% (1)	4.8% (1)
Middle school students	68	100.0% (68)	72.1% (49)	1.5% (1)	22.1% (15)
High school students	57	98.2% (56)	59.6% (34)	0.0% (0)	36.8% (21)

Data are presented as prevalence rate and number of people with bacteria.

*Streptococcus sobrinus*는 1.4% (2명), *Lactobacillus casei*는 25.3% (37명)로 나타났다(Table 2).

Table 3. The amounts of oral microbes in all subject

Micro-organism	Age group	N	The amounts of oral microbes		
			M	SD	P-value*
<i>S. mitis</i>	All	146	42702.4	49557.9	0.007
	Primary school	21	31257.1 ^a	39085.5	
	Middle school	68	56412.5 ^a	56326.9	
	High school	57	30563.2 ^a	39879.1	
<i>S. mutans</i>	All	146	10163.7	26426.5	0.003
	Primary school	21	537.6 ^a	1208.7	
	Middle school	68	5698.2 ^{ab}	10979.5	
	High school	57	19037.5 ^b	39043.4	
<i>S. sobrinus</i>	All	146	9.2	99.9	0.058
	Primary school	21	57.1	261.9	
	Middle school	68	2.1	17.0	
	High school	57	0.0	0.0	
<i>L. casei</i>	All	146	231.7	1120.1	0.101
	Primary school	21	1.4	6.5	
	Middle school	68	97.9	419.8	
	High school	57	476.0	1713.2	

Data are presented as number of bacteria.

M, mean; SD, standard deviation.

*P-value by one way ANOVA test.

^{a,b,c}Same letter means no statistical difference by Scheffe test.

Table 4. The amount of oral microbes in all subject

Micro-organism	Age group	N	The amounts of oral microbes		
			M	SD	P-value*
<i>S. mitis</i>	All	146	4.19	0.83	0.003
	Primary school	21	4.08 ^{ab}	0.70	
	Middle school	68	4.43 ^b	0.67	
	High school	57	3.94 ^a	0.98	
<i>S. mutans</i>	All	146	2.17	1.82	0.031
	Primary school	21	1.22 ^a	1.48	
	Middle school	68	2.40 ^b	1.65	
	High school	57	2.26 ^b	2.04	
<i>S. sobrinus</i>	All	146	0.04	0.31	0.178
	Primary school	21	0.15	0.67	
	Middle school	68	0.03	0.26	
	High school	57	0.00	0.00	
<i>L. casei</i>	All	146	0.57	1.06	0.008
	Primary school	21	0.07 ^a	0.32	
	Middle school	68	0.48 ^{ab}	0.95	
	High school	57	0.86 ^b	1.25	

Data are presented as log10 number of bacteria.

M, mean; SD, standard deviation.

*P-value by one way ANOVA test.

^{a,b,c}Same letter means no statistical difference by Scheffe test.

2. 연령에 따른 구강미생물의 평균 양

연령에 대한 *Streptococcus sobrinus*와 *Lactobacillus casei*는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났으나($P>0.05$), *Streptococcus*

Table 5. The amount of oral microbes in subject who have each oral microbe

Micro-organism	Age group	N	The amounts of oral microbes		
			M	SD	P-value*
<i>S. mitis</i>	All	145	42996.9	49601.3	0.008
	Primary school	21	31257.1 ^a	39085.5	
	Middle school	68	56412.5 ^a	56326.9	
	High school	56	31108.9 ^a	40024.7	
<i>S. mutans</i>	All	92	16129.4	31866.7	0.001
	Primary school	9	1254.4 ^a	1625.0	
	Middle school	49	7907.8 ^{ab}	12265.1	
	High school	34	31915.8 ^b	46511.9	
<i>S. sobrinus</i>	All	2	670.0	749.5	-
	Primary school	1	1200.0		
	Middle school	1	140.0		
	High school	0			
<i>L. casei</i>	All	37	914.1	2100.4	0.460
	Primary school	1	30.0		
	Middle school	15	444.0	823.8	
	High school	21	1292.0	2666.7	

Data are presented as number of bacteria.

M, mean; SD, standard deviation.

*P-value by one way ANOVA test.

^{a,b}Same letter means no statistical difference by Scheffe test.

Table 6. The amount of oral microbes in subject who have each oral microbe

Micro-organism	Age group	N	The amounts of oral microbes		
			M	SD	P-value*
<i>S. mitis</i>	All	145	4.21	0.76	0.006
	Primary school	21	4.08 ^a	0.70	
	Middle school	68	4.43 ^a	0.67	
	High school	56	4.01 ^a	0.83	
<i>S. mutans</i>	All	92	3.45	0.92	0.010
	Primary school	9	2.85 ^a	0.47	
	Middle school	49	3.33 ^{ab}	0.81	
	High school	34	3.78 ^b	1.05	
<i>S. sobrinus</i>	All	2	2.62	0.66	-
	Primary school	1	3.08		
	Middle school	1	2.15		
	High school	0			
<i>L. casei</i>	All	37	2.25	0.79	0.516
	Primary school	1	1.48 ^a		
	Middle school	15	2.17 ^{ab}	0.65	
	High school	21	2.34 ^b	0.88	

Data are presented as log10 number of bacteria.

M, mean; SD, standard deviation.

*P-value by one way ANOVA test.

^{a,b}Same letter means no statistical difference by Scheffe test.

Table 7. Correlation between oral microorganisms

	<i>S. mitis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>L. casei</i>
<i>S. mitis</i>	-	-0.108 (0.246)	0.068 (0.467)	-0.123 (0.188)
<i>S. mutans</i>	-0.108 (0.246)	-	-0.042 (0.654)	0.683 (<0.001)
<i>S. sobrinus</i>	0.068 (0.467)	-0.042 (0.654)	-	-0.024 (0.797)
<i>L. casei</i>	-0.123 (0.188)	0.683 (<0.001)	-0.024 (0.797)	-

Data are presented as Pearson Correlation and Significant (2-tailed).

*mitis*와 *Streptococcus mutans*는 유의한 차이를 보였다($P<0.05$, Table 3).

미생물 양을 로그지수로 변환 시켰을 때 *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*에서 연령에 따른 세균의 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($P<0.05$, Table 4).

3. 구강미생물 감염자의 평균 구강미생물 양과 상관관계

구강미생물 감염자에 대해 *Streptococcus mitis*는 총 146명 중 145명으로 평균 양이 42996.9로 나타났으며($P<0.05$), *Streptococcus mutans*는 92명으로 평균 양이 16129.4로 초등학교생 1254.4, 중학생 7907.8, 고등학생 31915.8로 미생물 감염자의 연령이 증가할수록 평균 미생물의 양도 증가하였다($P<0.05$, Table 5).

*Streptococcus mitis*와 *Streptococcus mutans*에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($P<0.05$, Table 6).

구강미생물 간의 상관관계 분석결과, *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus casei* 간에 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다($R=0.683$, $P<0.001$, Table 7).

고 안

치아우식증은 범발적이고 누적적인 만성질환이지만 체계적인 관리를 하면 예방이 가능한 질환이다¹³. 따라서 청소년기는 일생의 구강건강을 결정하는 중요한 시기이므로 건강한 삶을 위하여 치아우식증의 예방을 위해 철저한 관리가 필요한 시기이다.

이러한 치아우식증의 원인균으로 알려진 연쇄상 구균을 총칭하여 *Streptococcus mutans*라고 하며¹⁴, 주로 *Streptococcus mutans* 및 *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* 등이 있으며¹⁵, 이를 포함하여 *Lactobacillus casei*, *Actinomyces* 등이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁶.

Chosack 등¹⁷은 타액 내 *Streptococcus mutans* 수가 치아우식 발생에 영향을 끼친다고 보고함으로써 높은 수를 가진 사람은 우식 위험도가 매우 높다고 하였으며, Klock 등¹⁸은 *Streptococcus mutans*가 증식과 함께 우식발생이 증가됨에 따라 *Streptococcus mutans*의 수도 일반적으로 증가한다고 보고한 바 있다. 이번 연구에서도 연구대상자 146명 중 145명이 *Streptococcus mutans*의 감염자로 나타났다, 구강미생물 감염률은 *Streptococcus mitis* 100% (146명),

Streptococcus mutans 76.7% (89명), *Streptococcus sobrinus* 1.7% (2명), *Lactobacillus casei*는 30.2% (35명)로 나타났다.

Klock 등¹⁸은 스웨덴의 청소년과 성인을 대상으로 연구한 결과, 나이에 따른 우식과 타액 원인균 분포 또는 분비율과의 관계는 차이가 없다고 하였으나, 이번 연구에서는 *Streptococcus mutans*는 초등학교생 평균 537.6, 중학생 5698.2, 고등학생 19037.5로 연령이 증가할수록 구강미생물의 평균 양이 증가하는 것으로 조사되었다($P<0.05$). 또한, *Lactobacillus casei*는 유의성이 없는 것으로 나타났지만, 초등학교생 1.4, 중학생 97.9, 고등학생 476.0으로 연령이 증가할수록 미생물 평균의 양이 증가하였다.

구강미생물간의 상관관계를 분석결과 역시 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus casei* 간에 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다($P<0.001$). Gábris 등¹⁹ 또한 우식 원인균인 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacilli*의 수 사이에 상관관계가 있다고 보고하였으며, 이는 본 연구결과와 일치하였다. 이와 같은 결과는 우식 와동이 형성될 때까지 초기에는 *Streptococcus mutans*가 작용하고, 그 이후 *Lactobacillus casei*는 우식이 계속 진행되도록 하는 결과로 사료된다.

또한 연령이 증가함에 따라 치아우식 원인균의 증가는 청소년기의 치아우식증에 영향을 끼칠 수 있을 것이라 사료된다. 또한 치아는 한번 우식에 이환되면 다시 원래 상태로 되돌릴 수 없는 비가역적 손상을 입으며, 이환된 정도나 양에 따라 계속 축적되는 질환으로 청소년기는 치아우식증 증가의 중요성 인식 강화를 위한 교육을 통해 구강건강 습관 형성과 구강관리 태도 변화로 이행될 수 있도록 하는 것이 매우 중요하다고 사료된다.

결 론

아동 및 청소년 연령층에서 치아우식과 관련된 세균의 감염률을 확인하고자 146명을 대상으로 구강검사와 realtime PCR을 이용한 세균양 검사를 시행하였다. 그 결과 구강미생물 감염률은 총 146명 중 *Streptococcus mitis*는 99.3% (145명), *Streptococcus mutans* 63.0% (92명), *Streptococcus sobrinus* 1.4% (2명), *Lactobacillus casei*는 25.3% (37명)로 나타났다. 연령에 대한 *Streptococcus sobrinus*와 *Lactobacillus casei*는 차이가 없는 것으로 나타났으나($P>0.05$), *Streptococcus mutans*는 초등학교생 평균 537.6, 중학생 5698.2, 고등학생 19037.5로 연령이 증가할수록 구강미생물의 평균 양이 증가하는 것으로 조사되었다($P<0.05$). 구강미생물 감염자에 대해 평균 미생물 양은 *Streptococcus mitis*와 *Streptococcus mutans*에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($P<0.05$). 미생물 양을 로그지수로 변환하였을 때 또한 *Streptococcus mitis*와 *Streptococcus mutans*에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($P<0.05$). 구강미생물간 상관관계 분석 결과 *Streptococcus mutans*와 *Lactobacillus casei* 간에 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다($R=0.683$, $P<0.001$). *Streptococcus mutans*가 증가할수록 *Lactobacillus casei*가 증가하는 것으로 나타났다.

ORCID

Ye-Rim Mun, <https://orcid.org/0000-0002-9996-7793>

Ji-Hyeon Park, <https://orcid.org/0000-0001-7692-6377>

Ja-Won Cho, <https://orcid.org/0000-0003-1458-0416>

References

1. Kim EA, Jung YK, Kim KS. A study on the relations of health promoting daily life style and self-efficiency in boys' high. J Korean Soc School Health 2000;13:241-259.
2. Goals for oral health in the year 2000. Br Dent J 1982;152:21-22.
3. Kim JB, Choi EG, Moon HS, Kim JB, Kim DK, Lee HS, et al. Public Health Dentistry. 5th ed. Seoul:Komoonsa;2008:349-430.
4. Kim JB, Choi EG, Moon HS, Kim JB, Kim DK, Lee HS, et al. Public Health Dentistry. 4th ed. Seoul:Komoonsa;2004:53:70-71, 268-270.
5. Crossner CG. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. Community Dent Oral Epidemiol 1981;9:182-190.
6. Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1982;27:861-868.
7. Bretz WA, Djahjah C, Almeida RS, Hujoel PP, Loesche WJ. Relationship of microbial and salivary parameters with dental caries in Brazilian pre-school children. Community Dent Oral Epidemiol 1992;20:261-264.
8. Tukia-Kulmala H, Tenovu J. Intra- and inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, *lactobacilli*, and *mutans streptococci* among 11- to 12-year-old schoolchildren. Acta Odontol Scand 1993;51:31-37.
9. Slots J, Ashimoto A, Flynn M, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1995;20 (Suppl 2):S304-307.
10. Conrads G, Muters R, Fischer J, Brauner A, Lütticken R, Lampert F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. J Periodontol 1996;67:994-1003.
11. Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivaiis*, *Actinobacillus actinomycetemeomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. J Clin Periodontol 1996;23 (3 Pt 1):212-219.
12. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. J Clin Periodontol 2001;28:576-582.
13. Lee HW, Kim NJ, Jwa SK, Moon HR, Jeong JH. Dental survey for primary school student at Anseong-si. Int J Clin Prev Dent 2014;10:1-7.
14. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral *streptococci*. Oral Microbiol Immunol 1998;13:195-216.
15. Fitzgerald RJ, Keyes PH. Demonstration of the etiologic role of *streptococci* in experimental caries in the hamster. J Am Dent Assoc 1960;61:9-19.
16. De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirks O. The relationship between extracellular polysaccharide-producing streptococci and smooth surface caries in 13-year-old children. Caries Res 1969;3:190-199.
17. Chosack A, Cleaton-Jones P, Woods A, Matejka J. Caries prevalence and severity in the primary dentition and *Streptococcus mutans* levels in the saliva of preschoolchildren in South Africa. Community Dent Oral Epidemiol 1988;16:289-291.
18. Klock B, Svanberg M, Petersson LG. Dental caries, *mutans streptococci*, *lactobacilli*, and saliva secretion rate in adults. Community Dent Oral Epidemiol 1990;18:249-252.
19. Gábris K, Nagy G, Madléna M, Dénes Z, Márton S, Keszthelyi G, et al. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. Caries Res 1999;33:191-195.