

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA Y SUS APLICACIONES EN LA INVESTIGACIÓN ODONTOLÓGICA

Yesenia Carolina Romero Herazo*, Antonio José Díaz Caballero**, Barbara Arroyo Salgado ***
y Vivian Villalba Vizcaino ****

RESUMEN

Los avances de las ciencias básicas y la tecnología aplicada a los diversos campos de investigación, facilitan la caracterización microbiológica de la mayoría de patologías orales. Es por esto que desde hace un tiempo hasta el presente, métodos que permiten identificar fenotipos tales como cultivos, pruebas bioquímicas y tinciones, se convirtieron en gran ayuda para lograr ese objetivo en la búsqueda de respuestas a los interrogantes microbiológicos, lo mismo que sucede en aquellas circunstancias donde los organismos presentan retos para su aislamiento. Es allí donde la identificación se puede realizar a partir de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación in situ, secuenciación, análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP) entre diversos métodos con los que se cuenta en la actualidad. La identificación adecuada y certera de genotipos en la patología, permite diseñar mejores estrategias de tratamiento que lleven a la curación de los pacientes y a la implementación de programas de prevención óptimos, evitando la recidiva de patologías clínicas en la Odontología moderna. (DUAZARY 2010, 247 - 256)

Palabras clave: Reacción en cadena de la polimerasa, Hibridación in situ, crecimiento bacteriano, microbiología, periodoncia, endodoncia.

ABSTRACT

Advances in basic science and applied technology to various fields of research, facilitate the microbiological characteristics of most oral diseases. That is why for some time until the present, methods such as microorganism culture, staining techniques and biochemical tests, became a great help to achieve that objective in seeking answers to the questions microbiological same as those circumstances where agencies present challenges to its isolation. This is where the identification can be made from molecular techniques such as the polymerase chain reaction of (PCR), in situ hybridization, sequencing, polymorphism analysis of restriction fragment (RFLP) between different methods with which they are at present. Adequate and accurate identification of the specific organism in the pathology allows designing better treatment strategies that lead to the cure of patients and implementation of optimal prevention programs, avoiding the recurrence of clinical pathology in modern dentistry.

Keywords: Polymerase chain reaction, in situ hybridization, culture media, microbiology, periodontics, endodontics.

* Bacterióloga, Universidad de San Buenaventura, estudiante de Maestría de Microbiología, Universidad de Cartagena. yecaro@hotmail.com.

** Odontólogo, Universidad de Cartagena, Periodoncista Universidad Javeriana, Magíster en Educación Universidad del Norte Candidato a Doctorado en Ciencias Biomédicas Universidad de Cartagena. Profesor Titular Facultad de Odontología Universidad de Cartagena. antoniodiazc@yahoo.com.

*** Bacterióloga, Universidad Metropolitana, Magíster en Microbiología Pontificia Universidad Javeriana. Profesor Asociado Facultad de Medicina Universidad de Cartagena. barbarajulia67@yahoo.es.

**** Médico, Universidad de Cartagena, Magíster en Inmunología Universidad de Cartagena. Profesor Auxiliar Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Cartagena. vivianita811022@yahoo.com.

INTRODUCCIÓN

La identificación de las especies bacterianas dentro de las ciencias básicas aplicadas a las ciencias de la salud, se realiza convencionalmente a través de cultivos, pruebas bioquímicas y tinciones para la adecuada identificación y caracterización del microorganismo y su morfología. En la actualidad, este campo permite observar un gran avance gracias al desarrollo de técnicas aplicadas a la investigación en Odontología basándose en la Biología y la Genética molecular¹⁻³.

El perfeccionamiento de las técnicas moleculares, particularmente de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) facilita en gran manera el estudio y caracterización de diversos microorganismos, que anteriormente representaban un reto para su aislamiento a través de técnicas convencionales (identificación fenotípica utilizando medios de cultivo y tinciones)⁴⁻⁶. La aplicación de la Biología y Genética Molecular a la Microbiología permitió profundizar en el conocimiento de la estructura genómica de los microorganismos para comprender los mecanismos patogénicos en las diversas enfermedades que afectan a los seres vivos especialmente a los humanos⁷⁻¹⁰.

La PCR es una técnica de amplio uso en las investigaciones debido a su alta sensibilidad y especificidad, además no requiere la obtención de gran cantidad de organismos de muestra, debido a que amplifica la muestra de ADN a partir de un número muy pequeño de copias, contrario a lo observado en otras técnicas microbiológicas¹¹⁻¹⁴.

CULTIVOS

En la última década se estudiaron los microorganismos patógenos del tracto respiratorio superior y de algunos sitios de la cavidad oral, por medio de la utilización de cultivos en medios líquidos, sólidos y semisólidos¹⁵⁻¹⁸.

Estos medios permitieron por muchos años la identificación fenotípica de bacterias productoras de diversas patologías en el tracto respiratorio superior, pues se trataban de microorganismos aerobios estrictos o facultativos fáciles de cultivar^{19, 20}; caso contrario a lo que ocurre en la cavidad oral en donde la mayoría de microorganismos que causan los trastornos son anaerobios estrictos, por lo que la recuperación de estos a través de cultivos es muy compleja y no se obtienen los resultados esperados en un gran rango de experimentos

realizados, ya que se observa ausencia de crecimiento en los medios aunque existan signos clínicos de enfermedad en los pacientes bien sea en dientes, encías, paladar, lengua y demás estructuras que componen la cavidad oral y que de forma rutinaria pueden verse afectados por estos microorganismos y así mismo producir diversas infecciones o patologías²¹.

A través de los cultivos se puede realizar un total aislamiento e identificación del patógeno que está causando la enfermedad en la cavidad oral, es así como existen protocolos establecidos para cada una de las diferentes muestras a cultivar, donde se emplean medios de cultivo específicos para la recuperación e identificación y su respectivo antibiograma, para así de esta forma mirar el grado de sensibilidad y posible resistencia a los antibióticos utilizados en el tratamiento y al conseguir aislar las cepas en cultivos puros se puede realizar los respectivos estudios moleculares²²⁻²⁴.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde, para obtener suficiente material genético que permita una identificación microbiológica certera^{25, 26}.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad que tiene las DNA polimerasas para replicar las hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que las polimerasas vuelvan a unirse a los segmentos de ADN para que vuelvan a duplicarlas²⁷⁻²⁹.

En los inicios la técnica era lenta, debido a que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura (95°C) y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo, para lo cual luego de múltiples investigaciones se encontraron DNA polimerasas termoestables extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos^{30, 31}.

En la actualidad todo el proceso es automatizado con el empleo de un equipo llamado termociclador, el

cual permite calentar y enfriar los tubos de reacción a la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción, basándose en la aplicación del efecto peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos de reacción simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos empleados en la técnica de PCR son de una capa muy delgada lo cual permite que exista una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico^{32, 33}.

La PCR es una técnica cotidiana y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una variedad de aplicaciones dentro de las que encontramos la clonación de ADN para su secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y pruebas de paternidad), la detección y el diagnóstico de enfermedades infecciosas tales como se pueden observar en la cavidad oral^{11, 34}.

La reacción en cadena de la polimerasa es una herramienta biotecnológica muy útil para el diagnóstico de bacterias o virus de difícil cultivo *in vitro*. En el área de la Odontología son muchos los avances científicos que se hicieron en investigación ya que se consiguió la caracterización de la mayoría de los patógenos de la cavidad oral y es gracias a la PCR que se pudo conocer con exactitud los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la enfermedad periodontal, de la caries dental, entre otras patologías^{2, 35, 36}.

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La técnica de hibridación *in situ* esta basada en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos para hibridarse entre si, es decir la existencia de determinada secuencia de ADN o ARN, que resulta complementaria con otra secuencia^{37, 38}.

Su utilidad reside en la capacidad de poder demostrar mediante la utilización de una sonda (formada por una secuencia de ADN previamente conocida) marcada con un isótopo radiactivo, la presencia de determinada secuencia de ADN o ARN complementaria, en la muestra a estudiar^{39, 40}. Resultando mediante la utilización de esta técnica, la hibridación (unión) de la sonda marcada con la secuencia a buscar (en el caso de estar presente en la muestra) y posteriormente mediante técnicas específicas (autoradiografía, inmunohistoquímica), se de la transformación de la secuencia de ADN o ARN

en algo visible que demuestre la presencia de está en la muestra estudiada^{41, 42}.

En general la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (*in vitro*) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (*in situ*). Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales, no son de elección para su uso rutinario. Las técnicas no-isotópicas o calorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y mucho más económicas. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de métodos isotópicos. Se utilizan sondas marcadas con biotina y digoxigenina⁴³⁻⁴⁵.

La sensibilidad de la técnica depende de su efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad de ADN celular blanco o ARN^{46, 47}; del tipos de sondas, eficiencia de la marcación de la sonda y sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal^{48, 49} y del efecto de las condiciones de hibridación *in situ* sobre la eficiencia de la hibridación^{50, 51}.

La hibridación *in situ* se utiliza primordialmente en la detección de un bajo número de copias de virus, en particular virus como agentes infecciosos (*Citomegalovirus*) y como agentes carcinógenos tales como *Papillomavirus* humanos⁵², virus de la *Hepatitis B*^{53, 54}, virus de *Epstein barr*^{55, 56}.

APLICACIÓN CLÍNICA DENTRO DE LAS ESPECIALIDADES ODONTOLÓGICAS

La biología molecular se establece como una herramienta indispensable para los profesionales de la salud^{57, 58}, se utiliza para la identificación de enfermedades de origen genético, infecciosas y neoplásicas^{59, 60}. En el campo de la odontología se conocen muchas aplicaciones de la utilidad que poseen los métodos de detección anteriormente descritos ya que a través de estos es como se están llevando a cabo las últimas investigaciones en áreas como periodoncia, endodoncia, estomatología, microbiología oral entre otras áreas de estudio^{2, 36, 61, 62}.

En el área de la Periodoncia con esta metodología se realizan estudios muy importantes tales como la descripción de perfiles epidemiológicos de microorganismos que son útiles para el tratamiento de patologías periodontales como son la pericoronitis,

periodontitis agresivas, abscesos periodontales, gingivitis ulcerativas y lesiones periapicales entre otros⁶³⁻⁶⁷.

Con la implementación de los análisis tecnológicos la detección de patógenos utilizando la reacción en cadena a la polimerasa (PCR), mejorará la capacidad de identificación de bacterias específicas que intervienen, ya que ciertos microorganismos parecen estar en mayor proporción que otros en las diferentes patologías dentro de estas las periodontitis crónicas y las periodontitis agresivas. Muchas de estas bacterias son residentes en la cavidad bucal, compatibles con salud periodontal, pero otros operan como patógenos responsables de la destrucción presente en este tipo de periodontitis^{1, 68-70}.

Para especialidades como la endodoncia estas metodologías permitirían modificaciones importantes en la taxonomía bacteriana, sin embargo, no deben ser utilizadas aisladamente de las técnicas diagnosticas convencionales llevadas a cabo en los laboratorios, ya que ambas aportan datos complementarios que llevan a una tipificación taxonómica certera. Conocer y entender los microcosmos presentes aumentaría la tasa de éxito en los tratamientos de conductos realizados⁷¹⁻⁷⁴.

En la medida en que la microbiología ha evolucionado, en el área de la cavidad bucal, se han logrado aislar aproximadamente unas 400 especies microbianas en las infecciones del órgano dentinopulpar, de las cuales el 30% de ellas aun no se han podido cultivar *in vitro*. Sólo con la llegada de los avances en biología molecular la microbiota involucrada en dichos procesos infecciosos sufrió modificaciones, gracias a la información genotípica que permanecía oculta al protocolo tradicional de aislamiento e identificación de microorganismos en el laboratorio. La microbiota principalmente implicada en infecciones pulpares y periapicales, es una cuestión de interés no solo para los endodoncistas sino para los odontólogos y estudiantes de odontología⁷⁵⁻⁷⁷.

A partir de la introducción de las técnicas moleculares al interior del diagnostico microbiológico de la cavidad oral, se logró acceder al genoma bacteriano lo que implicó un cambio en la taxonomía de ciertos microorganismos ya conocidos y ayudó al descubrimiento de nuevos géneros y especies, estos hallazgos y modificaciones se asocian a diversos ordenes y *phylum* existentes según la homología que presente su ADN con el ADN de géneros y especies del mismo orden (método molecular); así observamos cambios significativos en el orden Eubacteriales y Actinomycetales, en la Familia Coriobacteriaceae (con el descubrimiento de géneros nuevos como *Cantonella*

sp., *Mogibacterium sp.* y *Cryptobacterium sp.* y en el orden Spirochaetales, no solo se descubrieron especies nuevas de *Treponema*, sino también se dilucidó de forma avanzada el papel que juegan en las infecciones endodónticas considerando su elevada incidencia en las mismas⁷⁸⁻⁸¹.

Los avances introducidos en el diagnóstico microbiológico, favorecen al profesional de las distintas ramas de la odontología, debido a que en la mayoría de las alteraciones de la pulpa están involucrados patógenos y el propósito de la terapia es crear condiciones que no favorezcan esta proliferación; al tener mayor conocimiento de los microorganismos que están actuando en las numerosas patologías orales tendremos mejor manejo de sustancias antimicrobianas utilizadas durante el tratamiento y mayor efectividad al elegir la antibioticoterapia, lo que nos llevará al logro de mayor número de casos exitosos⁸²⁻⁸⁶.

Cabe resaltar que la PCR es la prueba de elección mas utilizada en la mayoría de las investigaciones odontológicas en la actualidad en los centros de investigación mas importantes en Colombia y alrededor del mundo, debido a que esta es una técnica biotecnológica que tiene como fin el amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica de ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación, además de que la cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le da una alta sensibilidad a la prueba y facilita el trabajo a los investigadores en los proyectos donde se toman cantidades mínimas de muestra para estudiar^{29, 49, 87, 88}.

Al realizar una búsqueda en la base de datos Pubmed del National Center for Biotechnology Information, se seleccionan como palabras claves en inglés los términos "pcr" and "dentistry" and "research", al plantear como limitadores de búsqueda los siguientes parámetros: enlace a texto completo gratis, en idiomas inglés, español y portugués, utilizando como tiempo de publicación los últimos dos años, arroja como resultado un número de 102 encuentros dentro de sus publicaciones. Lo que permite dilucidar de manera clara y contundente, que las publicaciones relacionadas con el tema del presente artículo, tienen una alta importancia dentro del campo de la investigación en Odontología en la actualidad, con una amplia y variada diversidad de campos temáticos, de investigación y en especial dentro de las publicaciones

biomédicas que se exploran en la actualidad. Dentro de esos resultados, se pueden citar de forma breve, algunos temas como el control génico de condiciones asociadas a los carcinomas orales⁸⁹⁻⁹¹, también se encuentran temas tales como la diferenciación celular osteoblástica⁹², la asociación entre *Herpes virus* oral y las células madres hematopoyéticas⁹³, la asociación entre diversos polimorfismos genéticos y la presencia de enfermedad periodontal en Brasil⁹⁴. Son tantos temas, tan diversos y tan ricos que el campo de la investigación en Odontología, se abre, siempre tratando de dar un giro marcado hacia la fortaleza de las ciencias básicas, de las ciencias biomédicas, para intentar explorar alternativas de mayor rigor y peso científico en la búsqueda de soluciones a tantas condiciones clínicas y patologías que afectan la cavidad oral⁹⁵⁻⁹⁷.

DISCUSIÓN

La PCR es muy útil dentro de los diversos campos de investigación en Odontología, entre muchas de sus aplicaciones, se puede utilizar en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo debido a que es una técnica de gran aplicabilidad por poseer una alta especificidad, sensibilidad y seguridad; porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Otra de sus ventajas radica en que la secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma, pero una vez completada su reproducción, esta puede ser separada del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa^{101, 102}.

Además gracias a que se masificó su utilización en diversos centro, laboratorios y clínicas, los costos disminuyeron con respecto a los costos de inicio del uso de este método ya que estos eran elevados en un principio y solo se realizaba en países con alto nivel tecnológico como América del Norte, Europa y Asia, en la actualidad aparte de estos continentes se esta realizando PCR en la gran mayoría de los países de Latinoamérica incluyendo a Colombia¹⁰³⁻¹⁰⁶.

Para concluir, se pueden establecer unos principios fundamentales que faciliten el desarrollo y devenir de las investigaciones en Odontología, basados en este tipo de recursos científicos actuales.

Todos los métodos presentados en el presente artículo para la identificación bacteriana son de gran importancia en el estudio de los microorganismos pero que cada uno se utiliza dependiendo de las necesidades de cada proyecto de investigación y sus fines prácticos^{107, 108}.

Se establece que los cultivos son de gran valor y significancia cuando se estudian microorganismos poco exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales y ambientales que favorezcan el crecimiento y proliferación de estos, a través de los cuales se logra una identificación total del microorganismo estudiado obteniéndose con esto unos resultados confiables tanto en el área clínica como en el área de investigación¹⁰⁹⁻¹¹¹.

La hibridación *in situ* se utiliza en los casos en que los microorganismos a estudiar en la investigación resultan difíciles o imposibles de cultivar, como en el caso de los virus que no se cultivan con medios convencionales y las bacterias que requieren exigencias nutricionales y ambientales que los medios de cultivo no les proporcionan por lo cual estas no se desarrollan en estos medios, que para poder estudiarse se utiliza esta técnica de diagnóstico. Se utiliza además cuando en la muestra el material a estudiar es insuficiente lo que proporciona una ventaja en los estudios microbiológicos especialmente en lo que compete al área de los virus que presentan un bajo número de copias¹¹².

La PCR es la técnica de elección que en la actualidad se utiliza con mayor frecuencia en los centros de investigación y laboratorios de referencia que cuentan con la infraestructura adecuada para su implementación, debido a su alta sensibilidad, especificidad, a los costos y además cuando existe ausencia de métodos diagnósticos alternativos o cuando estos son muy complejos, también se usa para mejorar la eficacia diagnóstica de campos de la ciencia como la Odontología, donde se pueden ir complementando métodos convencionales o si se requiere de un diagnóstico rápido y precoz del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico, con el uso de novedosas tecnologías^{10, 113-117}.

Esta técnica molecular además de las áreas de investigación ya expuestas abarca otros estudios como son el de la genotipificación, identificación de mutaciones, determinantes de resistencias a fármacos o de virulencia, epidemiología molecular entre otros^{13, 86, 118-120}.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, Susin C, Nonnenmacher CI, Mutters R, et al. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1483-90.
2. Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3334-40.
3. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Oct;23(5):384-90.
4. Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug;42(8):3655-60.
5. Dempsey KE, Riggio MP, Lennon A, Hannah VE, Ramage G, Allan D, et al. Identification of bacteria on the surface of clinically infected and non-infected prosthetic hip joints removed during revision arthroplasties by 16S rRNA gene sequencing and by microbiological culture. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):R46.
6. Ridley AM, Allen VM, Sharma M, Harris JA, Newell DG. Real-time PCR approach for detection of environmental sources of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Apr;74(8):2492-504.
7. Riggio MP, Lennon A, Rolph HJ, Hodge PJ, Donaldson A, Maxwell AJ, et al. Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. *Oral Dis*. 2008 Apr;14(3):251-8.
8. Bollet C, Vignoli C, De Micco P. Molecular cloning of a specific DNA probe for the identification of *Bacillus licheniformis*. *Microbiologica*. 1992 Jul;15(3):291-5.
9. Brooks JL, Moore AS, Patchett RA, Collins MD, Kroll RG. Use of the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes for the rapid detection and identification of *Carnobacterium* species from meat. *J Appl Bacteriol*. 1992 Apr;72(4):294-301.
10. Leake JL, Dowd SE, Wolcott RD, Zischkau AM. Identification of yeast in chronic wounds using new pathogen-detection technologies. *J Wound Care*. 2009 Mar;18(3):103-8.
11. Monstein HJ, Tarnberg M, Nilsson LE. Molecular identification of CTX-M and blaOXY/K1 beta-lactamase genes in Enterobacteriaceae by sequencing of universal M13-sequence tagged PCR-amplicons. *BMC Infect Dis*. 2009;9:7.
12. Hassan AA, Ulbegi-Mohyla H, Kanbar T, Alber J, Lammler C, Abdulmawjood A, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* isolates from infections of horses. *J Clin Microbiol*. 2009 Jan;47(1):124-8.
13. Chen L, Hu B, Qian G, Wang C, Yang W, Han Z, et al. Identification and molecular characterization of twin-arginine translocation system (Tat) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain PXO99. *Arch Microbiol*. 2009 Feb;191(2):163-70.
14. Carrillo JA, Gutierrez J, Garcia F, Munoz A, Villegas E, Rojas J, et al. Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Mar 19.
15. Zeng JF, Zhang W, Jiang HW, Ling JQ. [Isolation, cultivation and initial identification of Nanobacteria from dental pulp stone]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2006 Aug;41(8):498-501.
16. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):708-13.
17. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007 Jan;78(1):79-86.
18. Hegde PP, Andrade AT, Bhat K. Microbial contamination of "in use" bar soap in dental clinics. *Indian J Dent Res*. 2006 Apr-Jun;17(2):70-3.
19. Amorim Lde F, Toledo OA, Estrela CR, Decurcio Dde A, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J*. 2006;17(4):317-22.
20. Richardson L, McKibbins SM, Seibert W, Tyus J. Salivary count of *Streptococcus mutans* in elementary school children. *NDA J*. 1995 Dec;46(2):8-11.
21. Kunnen A, Blaauw J, van Doormaal JJ, van Pampus MG, van der Schans CP, Aarnoudse JG, et al. Women with a recent history of early-onset pre-eclampsia have a worse periodontal condition. *J Clin Periodontol*. 2007 Mar;34(3):202-7.
22. Waite RD, Curtis MA. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pyocin production affects population dynamics within mixed-culture biofilms. *J Bacteriol*. 2009 Feb;191(4):1349-54.
23. Franzman MR, Burnell KK, Dehkordi-Vakil FH, Guthmiller JM, Dawson DV, Brogden KA. Targeted antimicrobial activity of a specific IgG-SMAP28 conjugate against *Porphyromonas gingivalis* in a mixed culture. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Jan;33(1):14-20.
24. Torano Peraza G, Hernandez Vadell I, Baly A, Toledo Romani ME. [Validation of an ELISA assay for the

- quantification of antibodies against Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide]. *Rev Cubana Med Trop.* 2005 Sep-Dec;57(3):185-91.
25. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996 Aug;11(4):266-73.
 26. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Aug;96(2):215-22.
 27. Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Mar;61(3):1104-9.
 28. Romanov MN, Bato RV, Yokoyama MT, Rust SR. PCR detection and 16S rRNA sequence-based phylogeny of a novel *Propionibacterium acidipropionici* applicable for enhanced fermentation of high moisture corn. *J Appl Microbiol.* 2004;97(1):38-47.
 29. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Oshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004 Mar;48(3):195-9.
 30. Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Vet Microbiol.* 2004 Jun 21;101(2):83-9.
 31. Woubit S, Manso-Silvan L, Lorenzon S, Gaurivaud P, Poumarat F, Pellet MP, et al. A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: application to the diagnosis of contagious agalactia. *Mol Cell Probes.* 2007 Oct-Dec;21(5-6):391-9.
 32. Okwumabua O, O'Connor M, Shull E. A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Jan 21;218(1):79-84.
 33. Sheu SJ, Hwang WZ, Chen HC, Chiang YC, Tsen HY. Development and use of *tuf* gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products. *J Food Prot.* 2009 Jan;72(1):93-100.
 34. Oravcova K, Lopez-Enriquez L, Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M. *Mycoplasma agalactiae* p40 Gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):445-50.
 35. Martin FE. Carious pulpitis: microbiological and histopathological considerations. *Aust Endod J.* 2003 Dec;29(3):134-7.
 36. Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Aug;32(8):715-21.
 37. Dannewitz B, Edrich C, Tomakidi P, Kohl A, Gabbert O, Staehle HJ, et al. Elevated levels of gene expression for collagen and decorin in human gingival overgrowth. *J Clin Periodontol.* 2006 Jul;33(7):510-6.
 38. Banerjee A, Yasseri M, Munson M. A method for the detection and quantification of bacteria in human carious dentine using fluorescent in situ hybridisation. *J Dent.* 2002 Sep-Nov;30(7-8):359-63.
 39. Obara N, Suzuki Y, Nagai Y, Nishiyama H, Mizoguchi I, Takeda M. Expression of neural cell-adhesion molecule mRNA during mouse molar tooth development. *Arch Oral Biol.* 2002 Nov;47(11):805-13.
 40. Shen MM. Identification of differentially expressed genes in mouse development using differential display and in situ hybridization. *Methods.* 2001 May;24(1):15-27.
 41. Yan J, Bouchard EF, Samassekou O, Chen BZ. Identification of a human chromosome-specific interstitial telomere-like sequence (ITS) at 22q11.2 using double-strand PRINS. *Cytogenet Genome Res.* 2007;116(1-2):29-37.
 42. Lavery S. Preimplantation genetic diagnosis of haemophilia. *Br J Haematol.* 2009 Feb;144(3):303-7.
 43. Song LB, Yan J, Jian SW, Zhang L, Li MZ, Li D, et al. [Molecular mechanisms of tumorigenesis and metastasis in nasopharyngeal carcinoma cell sublines]. *Ai Zheng.* 2002 Feb;21(2):158-62.
 44. Song F, Zhang J, Gu A, Wu Y, Han L, He K, et al. Identification of *cryII*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cryII*-type gene. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Sep;69(9):5207-11.
 45. Pestel-Caron M, Graff G, Berthelot G, Pons JL, Lemeland JF. Molecular analysis of *Mycobacterium avium* isolates by using pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2450-5.
 46. Chen C, Brabham WW, Stultz BG, Frierson HF, Jr., Barrett JC, Sawyers CL, et al. Defining a common region of deletion at 13q21 in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001 Aug;31(4):333-44.
 47. Rouanet C, Reverchon S, Rodionov DA, Nasser W. Definition of a consensus DNA-binding site for PecS, a global regulator of virulence gene expression in *Erwinia chrysanthemi* and identification of new members of the PecS regulon. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16;279(29):30158-67.

48. Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP, Popoff MR. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Jan;61(1):389-92.
49. Hassan AA, Vossen A, Lammler C, Siebert U, Fernandez-Garayzabal JF. PCR amplification of species specific sequences of 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer region for identification of *Streptococcus phocae*. *Microbiol Res.* 2008;163(2):132-5.
50. Arnold C, Westland L, Mowat G, Underwood A, Magee J, Gharbia S. Single-nucleotide polymorphism-based differentiation and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis* from isolates or directly from sputum. *Clin Microbiol Infect.* 2005 Feb;11(2):122-30.
51. MacGregor BJ, Amann R. Single-stranded conformational polymorphism for separation of mixed rRNAs (rRNA-SSCP): a new method for profiling microbial communities. *Syst Appl Microbiol.* 2006 Dec;29(8):661-70.
52. Azua-Romeo J, Grasa-Ulrich JM, Azua-Blanco J, Grasa-Biec JM, Saviron-Tajahuerce R, Saviron-Cornudella R, et al. [Descriptive study of HPV prevalence in a private consultation]. *Rev Invest Clin.* 2004 Jul-Aug;56(4):460-5.
53. Khawaja RA, Khawaja AA. Hepatitis B virus genotypes: "clinical & therapeutic implications". *J Pak Med Assoc.* 2009 Feb;59(2):101-4.
54. Garcia ML, Byfield R, Robek MD. Hepatitis B Virus Replication and Release are Independent of Core Lysine Ubiquitination. *J Virol.* 2009 Feb 25.
55. Matsuda M, Iwanaga T, Hashimoto S, Uesugi T, Itagaki N. Primary Epstein-Barr virus-negative nasal-type natural killer/T cell lymphoma of the testis. *Leuk Res.* 2009 Mar 12.
56. Oka K, Nagayama R, Mori N. Epstein-Barr virus-associated proliferative disorder presenting as Hodgkin's lymphoma and developing as aggressive natural killer-cell leukemia 19 years later: A case report of composite lymphoma. *Pathol Res Pract.* 2009 Mar 6.
57. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):937-40.
58. Alpha CX, Guthmiller JM, Cummings HE, Schomberg LL, Noorani SM. Molecular analysis of *Peptostreptococcus* micros isolates from patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2001 Jul;72(7):877-82.
59. Gurkan A, Emingil G, Saygan BH, Cinarcik S, Atilla G, Kose T, et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Jul;78(7):1256-63.
60. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006 Jun;28(3):221-40.
61. Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci.* 2004 May;19(9):2388-98.
62. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Tamura K, Miyamoto E, et al. Detection and serotype distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Apr;22(2):136-9.
63. Castillo A, Mesa F, Liebana J, Garcia-Martinez O, Ruiz S, Garcia-Valdecasas J, et al. Periodontal and oral microbiological status of an adult population undergoing haemodialysis: a cross-sectional study. *Oral Dis.* 2007 Mar;13(2):198-205.
64. Novak MJ, Novak KF, Hodges JS, Kirakodu S, Govindaswami M, Diangelis A, et al. Periodontal bacterial profiles in pregnant women: response to treatment and associations with birth outcomes in the obstetrics and periodontal therapy (OPT) study. *J Periodontol.* 2008 Oct;79(10):1870-9.
65. Del Peloso Ribeiro E, Bittencourt S, Sallum EA, Nociti FH, Jr., Goncalves RB, Casati MZ. Periodontal debridement as a therapeutic approach for severe chronic periodontitis: a clinical, microbiological and immunological study. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(9):789-98.
66. Lee SF, Andrian E, Rowland E, Marquez IC. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of *Treponema denticola* infection. *Infect Immun.* 2009 Feb;77(2):694-8.
67. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated With Periodontal Disease ([Formula: see text]). *J Periodontol.* 2009 Mar;80(3):436-46.
68. Nishimura F, Taniguchi A, Yamaguchi-Morimoto M, Soga Y, Iwamoto Y, Kokeguchi S, et al. Periodontal infection and dyslipidemia in type 2 diabetics: association with increased HMG-CoA reductase expression. *Horm Metab Res.* 2006 Aug;38(8):530-5.
69. Patel M, Coogan M, Galpin JS. Periodontal pathogens in subgingival plaque of HIV-positive subjects with chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Jun;18(3):199-201.
70. Papapanou PN, Sedaghatfar MH, Demmer RT, Wolf DL, Yang J, Roth GA, et al. Periodontal therapy alters

- gene expression of peripheral blood monocytes. *J Clin Periodontol.* 2007 Sep;34(9):736-47.
71. Wang L, Zhang R, Peng B. Expression of a novel PDGF isoform, PDGF-C, in experimental periapical lesions. *J Endod.* 2009 Mar;35(3):377-81.
 72. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009 Jan;88(1):61-5.
 73. Li H, Chen V, Chen Y, Baumgartner JC, Machida CA. Herpesviruses in endodontic pathoses: association of Epstein-Barr virus with irreversible pulpitis and apical periodontitis. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):23-9.
 74. Killough SA, Lundy FT, Irwin CR. Substance P expression by human dental pulp fibroblasts: a potential role in neurogenic inflammation. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):73-7.
 75. Tamai R, Deng X, Kiyoura Y. *Porphyromonas gingivalis* with either *Tannerella forsythia* or *Treponema denticola* induces synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells. *Anaerobe.* 2009 Jan 3.
 76. Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):169-74.
 77. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.* 2009 Feb;58(Pt 2):155-62.
 78. Itoh T, Nakamura H, Kishi J, Hayakawa T. The activation of matrix metalloproteinases by a whole-cell extract from *Prevotella nigrescens*. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):55-9.
 79. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):282-90.
 80. Vejsova M, Buchta V, Kudiyirickal GM, Krivcikova L, Slezak R. [Yeasts isolated from the patients of the Department of Dentistry, University Hospital in Hradec Kralove in the period of 1996-2007]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2008 Oct;14(5):186-91.
 81. Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Sep;106(3):457-62.
 82. Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, et al. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2008 Oct;43(5):544-8.
 83. Soderling EM, Ekman TC, Taipale TJ. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations. *Curr Microbiol.* 2008 Apr;56(4):382-5.
 84. Sharma P, Mickel AK, Chogle S, Sharma PN, Han YW, Jones JJ. An evaluation of bacterial contamination of barriers used in periapical tissue regeneration: Part 2--Bacterial penetration. *Quintessence Int.* 2008 Mar;39(3):237-42.
 85. Salah R, Dar-Odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental Diseases. *BMC Oral Health.* 2008;8:17.
 86. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A, Thomson JM, Adams MD, Goglin K, et al. Rapid Determination of Quinolone Resistance in *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2009 Mar 18.
 87. Lee YE, Choi YH, Jeong SH, Kim HS, Lee SH, Song KB. Morphological changes in *Streptococcus mutans* after chewing gum containing xylitol for twelve months. *Curr Microbiol.* 2009 Apr;58(4):332-7.
 88. Emecen P, Akman AC, Hakki SS, Hakki EE, Demiralp B, Tozum TF, et al. ABM/P-15 modulates proliferation and mRNA synthesis of growth factors of periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand.* 2009;67(2):65-73.
 89. Gemenetzidis E, Bose A, Riaz AM, Chaplin T, Young BD, Ali M, et al. FOXM1 upregulation is an early event in human squamous cell carcinoma and it is enhanced by nicotine during malignant transformation. *PLoS ONE.* 2009;4(3):e4849.
 90. Reddy BY, Greco SJ, Patel PS, Trzaska KA, Rameshwar P. RE-1-silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 17;106(11):4408-13.
 91. Hong KO, Kim JH, Hong JS, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, et al. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009;28:28.
 92. Suzuki A, Takayama T, Suzuki N, Sato M, Fukuda T, Ito K. Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2009 Feb;41(2):108-15.
 93. Guimaraes AL, Gomes CC, da Silva LM, Correia-Silva Jde F, Victoria JM, Gomez RS, et al. Association between oral HSV-1 and survival in allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Feb;14(2):E62-8.
 94. Menezes NG, Colombo AP. Lack of association between the TNF-alpha -308 (G/A) genetic polymorphism and periodontal disease in Brazilians. *Braz Oral Res.* 2008 Oct-Dec;22(4):322-7.
 95. Kirakodu SS, Govindaswami M, Novak MJ, Ebersole JL, Novak KF. Optimizing qPCR for the Quantification of Periodontal Pathogens in a Complex Plaque Biofilm. *Open Dent J.* 2008;2:49-55.
 96. Costa JE, Gomes CC, Cota LO, Pataro AL, Silva JF, Gomez RS, et al. Polymorphism in the promoter region

- of the gene for 5-HTT in individuals with aggressive periodontitis. *J Oral Sci.* 2008 Jun;50(2):193-8.
97. Guzeldemir E, Gunhan M, Ozcelik O, Tastan H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in Turkish patients with localized aggressive periodontitis. *J Oral Sci.* 2008 Jun;50(2):151-9.
 98. Isaza MP, Duncan MS, Kaplan JB, Kachlany SC. Screen for leukotoxin mutants in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: genes of the phosphotransferase system are required for leukotoxin biosynthesis. *Infect Immun.* 2008 Aug;76(8):3561-8.
 99. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Knost S, Sautter RL, et al. Identification of oral bacteria in blood cultures by conventional versus molecular methods. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jun;105(6):720-4.
 100. Bagherian A, Nematollahi H, Afshari JT, Moheghi N. Comparison of allele frequency for HLA-DR and HLA-DQ between patients with ECC and caries-free children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2008 Mar;26(1):18-21.
 101. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008 May;34(5):537-40.
 102. Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Aug;102(2):247-53.
 103. Contreras A, Doan N, Chen C, Rusitanonta T, Flynn MJ, Slots J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000 Aug;15(4):269-72.
 104. Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Jun;23(3):239-44.
 105. Contreras A, Mardirossian A, Slots J. Herpesviruses in HIV-periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 Jan;28(1):96-102.
 106. Lafaurie GI, Contreras A, Baron A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):629-39.
 107. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod.* 2004 Jul;30(7):504-8.
 108. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR, Coelho AM. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001 Apr;91(4):468-71.
 109. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Magalhaes KM, Guimaraes-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Aug;22(4):266-71.
 110. Lee L, Tin S, Kelley ST. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. *BMC Microbiol.* 2007;7:27.
 111. de Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5523-7.
 112. Ruvieri DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child (Chic).* 2007 May-Aug;74(2):118-23.
 113. Yoshida Y, Sasaki T, Ito S, Tamura H, Kunimatsu K, Kato H. Identification and molecular characterization of tryptophanase encoded by *tnaA* in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology.* 2009 Mar;155(Pt 3):968-78.
 114. Xiao B, Li W, Guo G, Li B, Liu Z, Jia K, et al. Identification of small noncoding RNAs in *Helicobacter pylori* by a bioinformatics-based approach. *Curr Microbiol.* 2009 Mar;58(3):258-63.
 115. Van den Eede A, Martens A, Lipinska U, Struelens M, Deplano A, Denis O, et al. High occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in equine nasal samples. *Vet Microbiol.* 2009 Jan 1;133(1-2):138-44.
 116. Kobayashi H, Hall GS, Tuohy MJ, Knothe U, Procop GW, Bauer TW. Bilateral periprosthetic joint infection caused by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis, and identification of *Salmonella* sp using molecular techniques. *Int J Infect Dis.* 2009 Mar 6.
 117. John MA, Burden J, Stuart JI, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, et al. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):493-6.
 118. Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb;63(2):274-81.
 119. Dumrongphol Y, Hirota T, Kondo H, Aoki T, Hirono I. Identification of novel genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells. *Fish Shellfish Immunol.* 2009 Jan;26(1):197-200.
 120. Chaillou S, Daty M, Baraige F, Dudez AM, Anglade P, Jones R, et al. Intraspecies genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Feb;75(4):970-80.