

## 구강세균 유전자 검사(easy perio test)법을 이용한 치아우식 검사

윤한결<sup>1</sup>, 박성규<sup>2</sup>, 김 진<sup>3†</sup>

<sup>1</sup>에이라인치과, <sup>2</sup>와이디생명과학연구소, <sup>3</sup>가톨릭대학교 대전성모병원 치과

### The study of caries activity test by multiplex-quantity real time PCR with easy perio test

Han Gyeol Yun<sup>1</sup>, Seong Gyu Park<sup>2</sup>, Jin Kim<sup>3†</sup>

<sup>1</sup>A Line Dental Hospital, <sup>2</sup>YD Global Life Science Co., <sup>3</sup>Department of Dentistry, Daejeon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the competency of the Easyperio test, a genetic test method based on real time PCR for the detection of bacteria that cause dental caries and periodontal disease. To verify the validity of this text, various dental health evaluations were administered to 33 boys between the ages of 12 to 14, as this age group commonly experiences dental caries. These evaluations included a dental caries experience survey, a first molar health evaluation, the Dentocult *Streptococcus mutans* (SM) strip mutans, the Dentocult *Lactobacillus* spp (LB) test, and the Easyperio test. The correlation coefficients between the level of the Dentocult SM strip mutans and the dental caries experience were DT ( $R=0.570$ ,  $p=0.001$ ), DMFT ( $R=0.376$ ,  $p=0.031$ ), and first molar health ( $R=-0.395$ ,  $p=0.023$ ). The correlation coefficients between the amount of SM in the Easyperio test and dental caries experience were DT ( $R=0.528$ ,  $p=0.002$ ), DMFT ( $R=0.369$ ,  $p=0.035$ ), and first molar health ( $R=-0.426$ ,  $p=0.013$ ). The correlation coefficients between the level of the dentocult SM strip mutans and the SM amounts of the Easyperio test were S.mi ( $R=0.564$ ,  $p=0.001$ ) and S.mu ( $R=0.621$ ,  $p=0.002$ ). The correlation coefficients between the level of the Dentocult LB test and the SM amount of Easyperio test was S.mi ( $R=0.495$ ,  $p=0.003$ ). In conclusion, Easyperio test may be an easy and effective method for the differentiation and diagnosis of dental caries through quantitative and qualitative analysis of oral bacteria.

**Key Words:** Realtime PCR, Bacterial culture tests, Oral microorganisms

**Received:** August 26, 2018 **Revised:** September 30, 2018 **Accepted after revision:** October 10, 2018

**†Correspondence to** Jin Kim

Department of Dentistry, Daejeon St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 64 Daeheung-ro, Jung-gu, Daejeon 34943, Korea

**Tel:** +82-42-220-9030, **Fax:** +82-42-220-9032, **E-mail:** jinmagic63@daum.net

## I. 서론

치아 우식증은 법랑질, 상아질등의 치질이 파괴되어 무기질과 유기질이 이탈되어 생긴 치아결손 현상을 말하며 사람에게서 가장 빈발하는 만성병으로 일단 파괴된 치아조직은 재생되지 않는 축적적 질환으로 알려져 있다. 치아 우식증을 야기하는 매우 복잡한 요소로 숙주요인과 환경요인 및 병원체 요인으로 구분하고, 이 세 가지의 질병 발생요인이 서로 함께 복잡한 상호 작용을 함으로써 치아 우식증이 발생된다 하였다(Paik et al, 2011). 치아 우식증의 여러 요소 중 하나인 숙주요인으로는 치아요인과 타액요인 그리고 신체요인등이 있다고 알려져 있다. 치아요인은 치아 성분과 형태 그리고 치아의 위치와 배열등에 의해 우식발생 가능성이 있다는 것이다. 타액의 경우 타액의 성분, 수소이온 농도, 유출량, 점조도, 항균작용과 완충작용 등의 기능이 있으며 타액의 유출량이 적고, 타액의 점조도가 높으며, 타액의 수소이온 농도가 높고, 타액 완충작용이 안되고, 항균 작용이 없으면 우식병이 잘 생긴다고 알려져 있다(Kang et al, 2014). 마지막 신체요인의 경우 섭취유형과 문화유형의 영향 받는 생물학적인 요인과 연령과 유전, 가족력 등을 신체요인이라 한다. 타액의 성분 중 칼슘과 인산의 함량이 치아 우식증에는 직접적으로 영향을 준다고 볼 수 없으나 암모니아와 요소 성분에 우식억제 효과가 있을 지도 모른다. 특히 타액의 분비량과 점조도는 치면의 자정작용과 매우 밀접한 관계가 있다. 그러므로 우식 발생 요인 검사로 타액분비율 검사나 점조도 검사, 완충능 검사나 스나이더(Snyder test), Alban's test 등이 사용된다(Kim, 2014). 그러나 여러 가지 원인요소들이 균일하게 작용한다고 하더라도 각 개인의 특성에 따라 치아 우식증이 발생되거나, 발생되지 않을 수도 있다. 우 등은 개인의 특성에 따라 치아 우식증 발생 유무에 대해 언급하면서 이처럼 복잡한 양상을 띠고 있는 개인별 구강 발생요인을 가능한 대로 찾아내며 개인별 특성을 고려하여 효율적으로 치아 우식증

의 발생을 예방하고자 하는 일련의 검사과정을 언급하였다(Woo, 2008).

오랜 기간 치아우식 활성검사를 활용한 우식발생 여부를 예측하고자 하는 노력이 꾸준히 많은 연구들이 이루어져 왔고, 그중 타액과 치태에 관한 세균의 연구가 활발히 이루어져 왔으며, 타액 내에 존재하는 산생성균들이 치아우식 발생과 상관관계가 있음이 보고되고 있다(Kim et al, 2005). 구강내에는 상주하는 많은 세균이 존재하고 Levine et al(2014)는 치면에 세균막이 형성되어 세균이 붙어 살고있으며, 이것이 치아 우식증의 원인임을 확인하였다. 그는 이 세균막을 'dental plaque'라고 이름 하였고, 치면세균막에 붙어사는 세균들은 음식을 분해하여 산을 만들고, 분해된 산이 빠져나가지 못하도록 작용한다. 이 세균막에는 여러 가지 종류의 세균이 무수히 붙어서 사는 데 그들 중 치아 우식증을 유발하는 세균으로 *Streptococcus mutans* (Levine et al, 2014). 이러한 치아 우식 활성화 검사 방법 중 구강내 산 생성균의 검사 방법의 하나로 최근 multiplex quantity Realtime PCR (easy perio test) 방법을 이용한 구강내 세균의 종류 와 세균의 정량화 하는 방법이 사용되고 있다.

본 연구는 치아 우식발생과 연관된 구강내 산 생성균 검사법으로 multiplex quantity Realtime PCR (easy perio test) 법을 이용하여 구강내 산 생성균의 정량적 정성적 검사를 통한 간편하고 정확한 치아 우식 예측 방법을 제시하고 환자의 치아 우식 예방 및 치료 동기 유발 여부 및 예방 검사로서 적정성 여부를 알아보고자 한다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 우식발생과 관련한 타액의 산 생성균의 요소 및 치아 우식 경험 등을 평가하기 위해 치아 우식

증이 가장 호발 가능한 사춘기 무렵의 남학생들을 원하는 순으로 무작위로 12세 15명, 13세 13명, 14세 5명 총 33명을 선정하여 진행하였다.

## 2. 방법

### (1) 구강검사

#### ① 치아우식경험도 조사

치아 우식 경험도를 알아보기 위하여 구강내 환경을 사진으로 기록하고, 의자와 조명하에서 치경과 탐침을 이용하여 구강검사를 시행하였으며, 세계보건기구의 진단 기준에 따라 우식영구치(DT), 상실치아(MT), 우식충전영구치(FT)를 조사하였다.

#### ② 제1대구치 건강도 평가

상, 하악 좌우의 제1대구치의 건전, 우식, 충전 발견 지시, 발견상태에 따라 치아의 건강상태를 평가하는 지표로 건전 시 10점을 기준으로 우식 치면 1면당 1점씩 차감, 충전 치면은 0.5점씩 차감하여 제1대구치의 우식경험 치면에 관한 점수를 조사하였다.

#### ③ Streptococcus mutans 균(뮤탄스 연쇄상 구균) 검사(Dentocult SM strip mutans) (Fig. 1)

Dentocult SM 검사는 치아우식병의 원인균으로 알

려진 뮤탄스 연쇄상구균(*Streptococcus mutans*)만을 선택적으로 배양하여 양을 정량화함으로써 우식병 발생요인을 파악 할 수 있는 것이다. 검사 대상자에게 비가향 파라핀을 씹게한 후 screening strip을 검사자의 혀위에 올리고 입을 가볍게 다물게한다. 구강내 타액이 screening strip이 잘 묻도록 10초간 고정 후 배양액에 꽂은 다음 37°C에서 최소 48시간 배양한다. 면봉을 이용하여 4구간의 site strip은 구강 내 타액과 치면세균막을 채취하여 배양 후 판정표와 비교하여 1~4점으로 판정하였다(Table 1).

#### ④ 유산균 집락 검사(Lactobacillus colony count) (Fig. 2)

Lactobacillus균 검사를 양면의 배지를 이용하여 검사하는 방법이다. 왁스를 저작해 자극성 타액을 모은 후 채집된 타액을 스포이트를 이용해 슬라이드 양면에 충분한 도포를 한다. 이 슬라이드 배지는 타블렛을 넣은 용기에 넣고 밀봉 후 온도 37°C 배양기에서

Table 1. Decision of dentocult SM

Amount of <i>S.mutans</i>	Decision
10,000 CFU/ml ↓	1
10,000~100,000 CFU/ml	2
100,000~1,000,000 CFU/ml	3
1,000,000 CFU/ml ↓	4

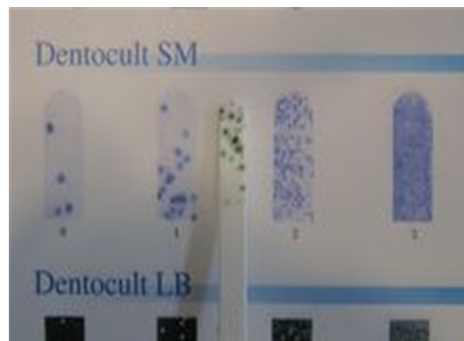


Fig. 1. Dentocult SM strip mutans reagents and checklist.



Fig. 2. Lactobucilli test (Dentocult LB) appliances and materials.

Table 2. Decision of dentocult LB

Amount of Lactobacillus	Decision
1,000 CFU/ml ↓	1
1,000~ 10,000 CFU/ml	2
10,000~100,000 FU/ml	3
100,000 CFU/ml ↓	4

48시간 배양하여 판정 사진 기준에 의거하여 그 정도를 비교하여 1~4점으로 판정하였다(Table 2).

### (2) 구강세균 유전자 미생물검사(Easyperio 제품 이용)

구강미생물의 종류와 양을 분석하기 위하여 real-time PCR법을 적용하기로 하고 제품은 와이드생명과학 Easyperio를 사용하여 분석하였다. Easyperio를 이용한 분석을 위한 방법은 약 20~30초간 구강내에서 가글을 한 후 그 용액을 Easyperio전용 수거용기에 채득하여, 분석기관 의뢰하고 구강 미생물의 종류와 양의 데이터를 확보하였다(Fig. 3).

### (3) 통계학적 분석

각 실험군에 있어서 계측된 위 연구 결과를 Microsoft

Excel 2016을 이용하여 자료를 저장하였으며, 통계 프로그램으로는 SPSS ver. 20 (SPSS inc. Chcago, IL, USA)을 사용하였다. Shapiro-Wilk test나 central limit theorem을 이용하여 실험군에서 정규성 만족 여부를 확인하였고, 모수적 검정 방법인 independent sample t-test를 이용하여 대상자의 구강미생물 수치, 대상자의 구강미생물 양과의 상관관계 등을 분석하여 통계처리 하였다.

## III. 결과

### 1. 치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 상관관계

치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 상관관계 분석 결과 Dentocult 검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균(sm)의 양과 우식치아 DT ( $R=0.570, p=0.001$ ), 우식 경험연구치수 DMFT ( $R=0.376, p=0.031$ ), 제1대구치 건강도 Molar 6 ( $R=-0.395, p=0.023$ )와 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다(Table 3).

### 2. 치아우식 경험도와 구강미생물양과의 상관관계

치아우식 경험도와 구강미생물양과의 상관관계 분석 결과 Realtime PCR검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균



Fig. 3. Easy perio inspection process. (1) Prepare a sample container set for genetic testing for dental caries. (2) Enable enough gaggle for more than 30 seconds using the gaggle solution. (3) Transfer the rinsed gaggle liquid to the prepared sample container.

Table 3. Correlation between dental caries experience and caries activity factors

		Dentocult SM	Dentocult LB
DT	R	.570	.137
	<i>p</i>	.001	.447
FT	R	.030	.044
	<i>p</i>	.869	.806
DMFT	R	.376	.118
	<i>p</i>	.031	.512
Molar6	R	-.395	-.146
	<i>p</i>	.023	.418

R: correlation coefficient, *p*: *p*-value, Dentocult SM: Results of Dentocult SM, Dentocult LB: Results of Dentocult LB, DT: Decayed teeth, FT: Filled teeth, DMFT: Decayed, Missing, Filled teeth, Molar 6: 1st molar health degree.

(sm)과 우식치아 DT ( $R=0.528, p=0.002$ ), 우식경험영구치수 DMFT ( $R=0.369, p=0.035$ ), 제1대구치건강도 Molar6 ( $R=-0.426, p=0.013$ )으로 나타났다(Table 4).

### 3. 구강미생물양과 우식활성요인과의 상관관계

구강미생물의 양과 우식활성요인과의 상관관계분석 결과 Dentocult 검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균 양과 S.mi ( $R=0.564, p=0.001$ ), S.mu ( $R=0.621, p=0.000$ ) 나타났으며, CRT검사서 LB의 양과 S.mi ( $R=0.495, p=0.003$ )으로 나타났다(Table 5).

Table 4. Correlation between dental caries experience and oral microbial content

		S.mi	S.mu	S.so	L/B
DT	R	0.326	0.528	0.131	0.122
	<i>p</i>	0.064	0.002	0.466	0.499
FT	R	-0.059	0.054	-0.195	0.113
	<i>p</i>	0.746	0.763	0.276	0.531
DMFT	R	0.159	0.369	-0.064	0.16
	<i>p</i>	0.377	0.035	0.723	0.374
Molar6	R	-0.151	-0.426	0.134	-0.064
	<i>p</i>	0.401	0.013	0.458	0.725

R: correlation coefficient, *p*: *p*-value, DT: Decayed teeth, FT: Filled teeth, DMFT: Decayed, Missing, Filled teeth, Molar 6: 1st molar health degree, S.mi: Streptococcus mitis, S.mu: Streptococcus mutans, S.so: Streptococcus sobrinus, L/B: Lactobacillus.

## IV. 고찰

구강내 치아 우식증을 야기하는 요소로서는 구강내 환경과 미생물의 종류와 여부, 타액의 분비량과 완충 능력 및 당분 함유성 식품의 섭취 등을 들 수 있다. 이들은 매우 복잡한 요소가 상호작용하여야 하며, 이러한 요인들을 크게 숙주요인과 환경요인 및 병원체 요인으로 구분하고, 이 세 가지의 질병 발생요인이 함께 작용함으로써 구강병이 발생하는 것으로 알려져 있다 (Paik et al, 2011).



**Table 5.** Correlation between oral microbial content and caries activity

		Molar6	Dentocult SM	Dentocult LB
S.Mi	R	-0.151	0.564	0.495
	<i>p</i>	0.401	0.001	0.003
S.Mu	R	-0.426	0.621	0.247
	<i>p</i>	0.013	0	0.165
S.So	R	0.134	0.184	0.336
	<i>p</i>	0.458	0.307	0.056
L/B	R	-0.064	0.132	0.26
	<i>p</i>	0.725	0.463	0.144

R: correlation coefficient, *p*: *p*-value, DT: Decayed teeth, FT: Filled teeth, DMFT: Decayed, Missing, Filled teeth, S.mi: Streptococcus mitis, S.mu: Streptococcus mutans, S.so: Streptococcus sobrinus, L/B: Lactobacillus, Molar 6: 1st molar health degree, Dentocult SM: Results of Dentocult SM, Dentocult LB: Results of Dentocult LB.

그러나 여러 가지 원인요소들이 균일하게 작용한다고 하더라도 각 개인의 특성에 따라 구강병이 발생되거나, 발생되지 않을 수도 있다. 이처럼 복잡한 양상을 띠고 있는 개인별 구강 발생요인을 가능한 대로 찾아내며, 각 개인의 특성을 고려하여 효율적으로 구강병의 발생을 예방하고자 하는 일련의 검사과정을 치아우식 활성 검사라고 한다(Kang et al, 2014).

지난 수년간 치아우식 활성검사를 활용한 우식발생 여부를 예측하고자 하는 노력이 꾸준히 진행되어왔으며, 많은 연구들이 이루어져 왔다(Choi et al, 2005). 그중 타액과 치태에 관한 세균의 연구는 활발히 이루어져 왔고, 타액 내에 존재하는 산생성균들이 치아우식 발생과 상관관계가 있음을 나타내는 연구들이 보고된 바 있고, 대표적인 산생성균에는 Streptococcus mutans, Streptococcus mitis, Streptococcus sobrinus, Lactobacillus casei 등이 있다. 치아우식 활성검사에서 주요 항목 중 하나는 이러한 산생성균의 양을 측정하는 것이 포함되어 있다. 이러한 구강내 산생성균의 검사하는 방법에는 snyder test, cariostat test, cariescreenSM검사, Dentocult SM검사법이 상용화 되어 사용되고 있다(Shin et al, 2003; Levine et al, 2014). 최근에는 Realtime PCR법을 이용한 구강내 세균들을 종류 및 그에 따른 세균들을 정량화 하는 방법이 개발되어 사용되기 시작하는 상태이며, 본 연

구를 통해 기존의 세균배양을 기본으로 하는 산생성균 검사법들과 Realtime PCR 법을 이용한 구강내 세균검사법을 비교하여 구강내 산생성균 검사의 기초자료로 이용하며, 보다 간편하고 정확한 예측방법으로 향후 임상에서 환자의 구강내 환경관련 예방 및 치료 동의를 동기유발 자료로서 활용여부를 알아보려 하였다(Levine et al, 2014).

치아우식 활성검사는 여러 가지의 필수조건이 있다. 그중 하나는 신뢰성을 갖추는 것이다. 신뢰성은 검사의 결과에서 우연한 결과가 아니라는 확인을 줄 수 있어야 하며, 측정하는 방법이나 기구의 타당성이 필요하다. 이상적인 우식활성 검사에서 갖춰야 할 조건은 1951년 Snyder에 의해 제시되었고 최근에도 다양한 방법으로 검토되어 왔다. 하지만 일반 개인치과의 원등에서 간편하게 사용되기 위해선 여러 가지 통제 변수관리의 어려움과, 우식활성 실험의 복잡함, 비용적인 측면에서 실험배지나, 현미경등 고가의 장비가 필요한 경우가 많았으며, 또한 결과를 보는 우식검사의 기준표가 색상의 차이로 결정하거나 세균의 분포를 3~5가지의 기준으로 판정하는 등의 평가자의 주관적으로 판단하는 모호함이 지적되어 왔다. 최근엔 위상차현미경을 통해 환자에게 모니터를 통해 구강내 세균을 보여줌으로써 동기유발의 한 자료로 채택되어, 구강세균의 양을 대략적으로 파악하고, 구강세균

의 활동성으로 세균이 움직이는 거리를 측정하며 판별해왔다. 이는 환자에게 칫솔질 전 후의 세균의 양과 움직임 등을 전달하여 동기유발 자료로 좋은 방법이였다. 하지만 정확한 세균의 이름과 종류의 수는 아니었고, 대략적으로 판단하였고, 장비를 구입할 때 고가의 초기비용이 발생할 수 있었다(Shin et al, 2003).

개인치과의원에서 간단한 방법으로 환자의 구강내 치아 우식균의 종류와 그 수를 정확히 파악할 수 있는 Realtime PCR방법을 활용하면, 환자에게 그에 맞는 투약이나, 칫솔습관의 조절을 유도 가능할 것으로 사료되었다.

실험 결과 Dentocult Bacterial검사 결과와 Realtime PCR의 유의성이 높았고 치아우식 활성 세균검사를 시행할 시 개량스나이더검사보다는 Dentocult bacteria검사법을 활용하거나, Realtime PCR 활용하는 것이 바람직하다고 사료되었다. 하지만, 저자는 환자에게 CRT bacteria검사방법을 시행하면서 5분 각 왁스를 제작해 자극성 타액을 모으고, 배지에 넣어 48시간동안 배양을 하는 복잡함과 배지의 손상이나 정확한 배양 시간 등 통제변수의 어려움을 택하기 보다는, 30초의 가글로 간편하게 환자의 타액 내 세균의 채취를 하여 Realtime PCR검사를 통해 정량화된 구강내 세균의 종류와 수를 파악하는 방법을 택하여 임상에서 환자의 치아우식의 구강미생물요인에 관한 예측방법을 활용하고 예방 및 치료 동의의 동기유발 자료로서 활용하는 것을 고려해야 한다고 사료된다.

## V. 결론

치아 우식증은 숙주요인, 세균성요인, 그리고 환경요인이라는 세 가지 요인과 시간적요인이 상호 작용을 함으로써 발생하는 다인성 질환이라는 특성을 가지고 있다. 그러나 여러 가지 원인 요소들이 균일하게 작용한다고 하더라도 각 개인의 특성에 따라 치아 우식증이 발생되거나 또는 발생되지 않을 수도 있다. 이처럼 각 개인의 특성을 고려하여 효율적으로 구강병

발생을 예방하고자 하는 검사 과정을 우식발생요인 검사라하고, 치아 우식병을 효과적으로 치료하기 위해 각 개인에게 치아 우식증이 발생하는 데에 작용하는 특이한 요인을 찾아 제거하여야 한다.

본 연구에서는 치아 우식검사 방법 중 구강세균 유전자 검사 방법인 Multiplex-Quantity Real Time PCR-easy perio test 법을 이용하여 우식 활성도가 높은 연령 13세에서 15세의 남학생을 무작위로 선정하여 시행하였다. 기존의 구강 검사와 비교하여 간편하고 정확한 예측 방법으로 easy perio test 방법으로 향후 임상에서 환자의 치아 우식에 질환에 대한 예측과 예방 및 치료 동기 유발 등에 효과적이었으며 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 상관관계분석 결과 Dentocult 검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균 양과 DT ( $R=0.570, p=0.001$ ), DMFT ( $R=0.376, p=0.031$ ), 제1대구치건강도( $R=-0.395, p=0.023$ )와 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다.

2. 치아우식 경험도와 easy perio test 검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균과 DT ( $R=0.528, p=0.002$ ), DMFT ( $R=0.369, p=0.035$ ), 제1대구치건강도( $R=-0.426, p=0.013$ )으로 나타났고, 구강미생물의 양과 우식활성요인과의 상관 관계분석 결과 Dentocult 검사에서 뮤탄스 연쇄상 구균 양과 S.mi ( $R=0.564 p=0.001$ ), S.mu ( $R=0.621, p=0.000$ ), S.mu10 ( $R=0.565, p=0.002$ )나타났으며, Dentocult 검사에서 LB의 양과 S.mi ( $R=0.495 p=0.003$ )으로 나타났다.

Dentocult Bacterial검사 결과와 Realtime PCR검사인 easy perio test의 결과값은 세균의 종류와 양에 관하여 높은 상관관계를 나타내어 우식활성 세균검사에 적합하였고 치아우식 활성 세균검사를 시행할 시 Dentocult bacteria검사법이나, Realtime PCR (easy perio test)활용하는 것이 바람직하다고 사료되었다. 하지만 보다 간편하고 정확한 예측방법을 활용하고자 하면, Realtime PCR 검사법(easy perio test)으로 임상에서 환자의 구강내 환경관련 예방 및 치료 동의

의 동기유발 자료로서 활용하는 것을 고려해야 한다고 사료된다. 아울러 최근 급증하는 임플란트 주위염과 만성 치주질환의 정확한 원인균을 알아보기 위해 Realtime PCR (easy perio test) 검사법에 대한 추가적인 연구가 요청된다.

## VI. 참고문헌

Choi SH, Shin SC, Kwon JH, Lyoo YJ, Kim IS, Chang YS, et al. Dental health capacity of the first permanent molars among Koreans. *J Korean Acad Dent Health* 2005;29(4):430-40.

Kang BW, Kim KS, Kang HG, Gu IY, Kim GY, Kim SS, et al. *Preventive dentistry*. 5th ed. Seoul: KoonJa Publisher.; 2014. pp. 25-48, 293-310.

Kim HE. Change of paradigms in caries-associated bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Hyg Sci* 2014;14(2):87-93.

Kim JG, Kim YS, Baik BJ, Yang YM. Relationship between salivary caries-related tests and dental caries experience in Korean dental college students. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2005;32(1):67-74.

Levine WZ, Samuels N, Williams RC. Effect of a botanical mouth rinse on dental plaque formation: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Oral Hyg Health* 2014;2:4.

Paik DI, Kim HD, Jin BH, Park YD, Shin SC, Cho JW, et al. *Clinical preventive dentistry*. 5th ed. Seoul: Komoonsa; 2011. pp. 23-41, 265-87.

Shin DK, Kim JY, Song KB, Nam SH. Relationship between Dentocult-SM test, microbial analysis and dental caries in the pre-school children. *J Korean Acad Pediatr Dent* 2003;30(2):254-62.

Woo HS. A study on the incremental oral health care of C pediatric clinic using a Dentocult-SM test. *J Dent Hyg Sci* 2008;8(2):39-51.