



Original Article

구강 세균 채취법에 따른 세균의 다양성과 양 분석을 위한 예비 연구

심선주¹, 김지혜¹, 신혜선²

¹백석대학교 치위생학과, ²동남보건대학교 치위생학과

Preliminary study on the diversity and quantity analysis of oral bacteria according to the sampling methods

Seon-Ju Sim¹, Ji-Hye Kim¹, Hye-Sun Shin²

¹Department of Dental Hygiene, Baekseok University

²Department of Dental Hygiene, Dongnam Health University

Corresponding Author: Hye-Sun Shin, Department of Dental Hygiene, Dongnam Health University, 50, Cheoncheon-ro, 74 beon-gil, Jangang-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, Korea. Tel: +82-10-5688-2319, Fax: +82-31-249-6500, E-mail: vivian@dongnam.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: Oral bacterial samples included subgingival, supragingival, and saliva plaques. As the diversity and number of microorganisms differ depending on the area of the oral cavity and the method used, an appropriate and reliable collection method is important. The present study investigated oral bacterial sampling methods. **Methods:** Supragingival dental plaque was collected from the buccal and lingual tooth surfaces of study participants using sterilized cotton swabs. Plaques were collected from the subgingival area using a sterilized curette. Bacterial genomic DNA was extracted using MagNA Pure 96 DNA and Viral NA low-volume kits. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using the PowerCheck™ Periodontitis Pathogens Multiplex Real-time PCR kit. **Results:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Fusobacterium nucleatum* of the orange complex were not observed in the subgingival biofilms of all study participants. For *Porphyromonas gingivalis*, a significant correlation was observed between supragingival, subgingival, and total tooth surface biofilms. Compared to the supragingival and subgingival biofilms, total tooth surface biofilm exhibited the highest bacterial count when the inswabbing method was used. **Conclusions:** Based on these findings, the supragingival swab method is recommended for oral bacterial research.

Key Words: Biofilm, Dental plaque, Real-time polymerase reaction, Specimen handling

색인: 세균, 치면세균막, 실시간 중합효소연쇄반응, 검체 채취

서론

구강은 다양한 미생물의 저장고이며 장 다음으로 큰 미생물 군집을 이룬다[1]. 구강 미생물은 개인에 따라 다양하며 특정 임상 증상, 미생물 환경, 그리고 다른 요인에 의해 변화된다. 많은 연구에서 구강 미생물은 치주염, 치아우식증, 점막염과 연관되어 있으며[2] 최근에는 신체 건강 과도 밀접하게 관련되어 있다고 보고되고 있다[3-7]. 그뿐만 아니라 특정 구강 내 미생물은 혈류나 소화기를 통해 전신에도 영향을 미쳐 당뇨, 심혈관질환, 암, 알츠하이머 치매의 발생에도 연관성이 있다고 보고되었다[3-7].

치은연하 치면세균막과 구강 내 경조직과 연조직 표면의 미생물은 세균막 형태로 존재하는데 특히 치은연하 세균막은 치주염이 발생에 주요한 역할을 한다고 보고되었다[8-11].

www.kci.go.kr

치은연하 치면세균막 채취를 위해서는 치은열구에 멸균된 큐렛이나 페이퍼포인트 흡수용 종이를 삽입 후에 채취하는 방법이 널리 사용되었다[12, 13]. 다만 큐렛을 사용하는 방법은 부착 치면세균막을 채취하는 방법이고[12] 치은열구액 흡수 종이는 치주낭 내 비부착 세균을 채취에 더 유용하다[13]. 그러나 큐렛을 사용하는 방법은 점막조직을 손상할 우려가 있으며 흡수용 종이를 사용하는 경우 열구 내에 삽입된 종이나 페이퍼 포인트가 저항감을 느끼게 되는 경우 유지가 어려울 수 있으며 건강한 치주조직에게는 페이퍼포인트나 종이가 잘삽입되지 않는다고 보고되었다[13,14].

구강질환 연구에서 미생물 채취 부위는 치은연하 치면세균막, 치은연상 치면세균막, 타액 등이 있는데 다양한 방법은 제시되었으나 부위별 방법별로 세균의 다양성과 양을 비교하지는 않았다[14]. 또한 치은연하 치면세균막과 치은연상 치면세균막 부위에서의 세균다양성과 세균량의 비교연구가 부족하다. 이와 같은 한계로 구강 내의 다양한 부위와 방법에 따라 미생물 다양성과 양의 차이가 크다면 적절한 채취 방법을 제시하는 것이 중요하다.

따라서 본 연구의 목적은 구강 내 치은연상 부위와 치은연하 부위의 치면세균막 채취 방법에 따라 세균의 다양성과 세균량을 비교하여 구강 세균총 연구를 위한 세균 채취법에 기초자료로 활용하고자 하는 것이다.

연구방법

1. 연구대상

2023년 6월 5일에서 2023년 6월 10일까지 연구 목적에 동의하고 참여한 19세 이상 11명을 대상으로 진행하였으며, 특이한 전신질환이 없고 흡연 및 음주를 하지 않으며 치주염 진단을 받지 않은 자로 하였다. 성별과 연령 분포는 남성 6명과 여성 5명, 평균 연령은 36.7세(연령 범위: 20-49세)였다. 연구대상자 표본 수 선정은 G*power program 3.1을 이용하여 계산하였다. 효과크기 0.57, 유의수준(α -error) 0.05, 검정력 ($1-\beta$ -error) 0.8, 비교그룹 3그룹으로 설정하여 표본 수를 산출한 결과 총 33명으로 집계되었다. 치주염은 치주낭 깊이가 평균 3 mm 이하, 잔존 치 20개 이상(제3대구치 제외), 연구 3개월 전 항생제를 복용하지 않는 자로 선별하였다. 대상자들은 편의추출방법으로 선택하였다. 연구는 백석대학교 연구윤리심의위원회의 승인을 받았다(BUIRB-202305- HR-011).

2. 검체 채취

검체 채취는 훈련된 1명의 치과의사와 1명의 치과위생사에 의해 진행되었으며 선행연구 방법에 따라 3가지로 진행되었다[14]. 치은연하 치면세균막(subgingival plaque)은 멸균된 구치부용 큐렛(Hu-Friedy Group, USA)을 이용하여 하악과 상악 제1대구치 치은연하 부위에서 채취하였으며 치은연상 치면세균막(supragingival plaque)은 멸균된 면봉(NB Swab, Noble Bio, Korea)을 이용하여 상·하악 제1대구치 협측 및 설측 치면의 치면세균막을 채취하였다. 그리고 전체 치면 치면세균막(whole plaque)은 멸균된 면봉을 이용하여 전체 치면을 1분간 문지르는 방법으로 채취하였다. 채취된 검체는 멸균된 보존액(Noblebio Biosciences, Kyeonggi-do, Korea)에 보관 후, 분석의뢰기관(GC Genome, Green Croos Laboratories, Yongin, Korea)으로 이송 후 30초간 현탁(Vortexing)한 후 분석하였다.

3. DNA 추출 및 구강 미생물 분석

본 연구의 구강 세균 검사에 활용되는 세균은 총 10종으로서 Socrasky에 따른 고병원성 세균인 Aa complex 및 red complex에 속하는 4종과 중등도 병원성 세균인 orange complex에 속하는 3종, 그리고 최근 연구에서 만성 치주염과 관련이 있는 것으로 보고된 3종의 균이 포함되어 있다[15-21] <Fig. 1>. 각 구강 세균의 표적 유전자는 <Table 1>에 기술하였다.

제조업체의 지침에 따라 MagNA Pure 96 DNA 및 Viral NA 소량 키트(Roche Diagnostics, Germany)를 사용하여 박테리아 게놈 DNA를 추출했다. DNA 농도는 Qubit™ dsDNA HS Assay Kit를 사용하여 Qubit®3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA)에서 형광측정법으로 측정되었다.

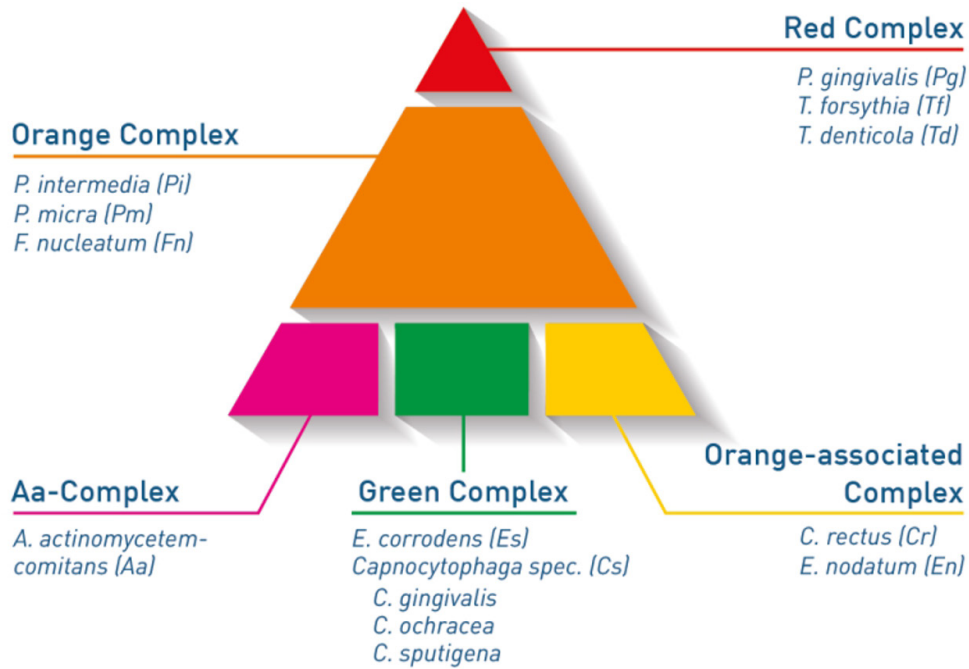


Fig. 1. Socransky classification for oral bacteria

본 연구의 Red complex, Orange complex, Aa complex 등 10종의 치주염 관련 병원체를 검출하기 위해서 PowerCheck™ 치주염 병원체 다중 Real-time PCR 키트(KogeneBiotech, SEOUL, Korea)를 이용하였으며 각 세균의 검출량은 CFX-96 실시간PCR 검출 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 분석되었다. 증폭은 50°C와 95°C에서 각각 2분, 10분 동안 예열과 초기 용융으로 수행되었으며, 이후 95°C에서 40주기 변성되었다. 15초 동안 가열 냉각하고 60°C에서 1분 동안 연장했다. 알려진 박테리아 복사본의 연속적인 10배 희석을 증폭하여 얻은 Ct (threshold cycle: 역치 형광에 도달한 주기 수) 값을 사용하여 각 primer-probe 세트에 대해 각 유기체에 대한 표준 곡선이 구성되었다.

Table 1. Target genes of oral bacteria included in the PowerCheck™ periodontitis pathogens multiplex Real-Time PCR Kit

Socransky complex	Oral bacteria	Target gene
Aa complex	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (<i>A. actinomycetemcomitans</i>)	fts I
Red complex	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. gingivalis</i>)	waaA
	<i>Tannerella forsythia</i> (<i>T. forsythia</i>)	fts Z
	<i>Treponema denticola</i> (<i>T. denticola</i>)	fts K
Orange complex	<i>Prevotella intermedia</i> (<i>P. intermedia</i>)	piACP
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (<i>F. nucleatum</i>)	rpoB
	<i>Parvimonas micra</i> (<i>P. micra</i>)	fus A
Others	<i>Filifactor alocis</i> (<i>F. alocis</i>)	gyr B
	<i>Porphyromonas endodontalis</i> (<i>P. endodontalis</i>)	16S
	<i>Treponema socranskii</i> (<i>T. socranskii</i>)	16S

4. 자료분석

구강 내에서 채취한 구강 세균 10종은 기술 분석했다. 또한 정규분포를 이루지 않고 표본 수가 적어서, 모두 비모수 통계분석을 했다. 3가지 채취 방법에 따른 구강 세균량의 평균 순위 비교는 크루스칼-윌리스 검정(Kruskal-Wallis test)으로 분석하였다. 또한 각 채취 방법에 따른 구강 세균량이 채취 방법마다 서로 관계가 있는지 알아보려고 스피어만 순위상관 분석(Spearman's rank correlation analysis)으로 확인하였다. 본 연구의 실험 자료는 PASW 통계패키지(ver. 29.0; SPSS Inc, chicogo IL, USA)을 이용하여 분석하였다.

연구결과

1. 치면세균막 채취법에 따른 구강 세균 10종의 기본적인 분포

모든 대상자의 세균막에서 *P. intermedia*와 *F. nucleatum*은 전혀 관찰되지 않았으며, *A. actinomycetemcomitans*도 표본 1 부위 소량 검출된 것을 제외하고는 관찰되지 않았다. 모든 세균에서 세균량의 최솟값과 최댓값은 편차가 컸고, 왜도와 첨도 또한 커서 검출된 세균 값은 정규분포를 이루지 않았다. 이 결과는 Shapiro-Wilk test를 통해 정규성 검정을 한 결과, 10가지 모든 구강세균에 대해서 $p < 0.05$ 로 작아 정규성을 따르지 않음을 재확인하였다.

2. 치면세균막 채취법에 따른 구강 내 세균량 비교

<Table 2>는 치면세균막 채취법에 따라 세균의 양과 다양성에 대한 평균 순위 차이 검정 결과이다. 비모수분석방법인 Kruskal-Wallis test의 주요 결과인 평균 순위를 제시하였고, 이해를 돕기 위해 집락수의 평균과 표준편차를 같이 제시하였다. 10개의 세균 중 미검출된 값이 있는 *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* 3개의 세균을 제외하고 나머지 채취 부위 중 전체 치면세균막에서 가장 높았다. 이는 *P. endodontalis*를 제외하고는 모든 세균에서 통계적으로 유의미한 차이는 없었으나, 전체 치면세균막에서 많은 양의 세균이 검출되는 경향을 보였다.

또한 채취 방법마다 검출된 세균량 사이에 서로 관계가 있는지 알아보려고 스피어만순위상관계수(r_s)를 산출하였다. *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 세균은 치은연상 세균막, 치은연하 세균막, 전체 치면세균막 모두 강한 상관성이 관찰되었다.

Table 2. The quantities and variety of periodontal bacteria by plaque sampling site

Bacteria	Sampling method	M	SD	Mean Rank	p^*	r_s^a	r_s^b	r_s^c
<i>A. actinomycetem comitans</i>	Supragingival plaque	0.55	1.81	18.00	0.368			
	Subgingival plaque	0.00	0.00	16.50				
	Whole plaque	0.00	0.00	16.50				
<i>P. gingivalis</i>	Supragingival plaque	149.05	465.42	16.73	0.429	0.840**	0.778**	0.879**
	Subgingival plaque	5.49	12.28	15.05				
	Whole plaque	730.38	1,290.91	19.23				
<i>T. forsythia</i>	Supragingival plaque	81.44	194.42	16.91	0.089	0.662*	0.705*	0.762**
	Subgingival plaque	18.10	41.18	13.05				
	Whole plaque	318.71	449.73	21.05				
<i>T. denticola</i>	Supragingival plaque	190.21	609.51	17.32	0.752	0.590	0.671*	0.995**
	Subgingival plaque	67.86	225.08	15.91				
	Whole plaque	529.82	1,178.77	17.77				
<i>P. intermedia</i>	Supragingival plaque	0.00	0.00	-	-	-	-	-
	Subgingival plaque	0.00	0.00	-				
	Whole plaque	0.00	0.00	-				
<i>F. nucleatum</i>	Supragingival plaque	0.00	0.00	-	-	-	-	-
	Subgingival plaque	0.00	0.00	-				
	Whole plaque	0.00	0.00	-				
<i>P. micra</i>	Supragingival plaque	177.37	197.43	13.23	0.270	-	0.150	0.500
	Subgingival plaque	952.86	1,702.10	18.23				
	Whole plaque	363.75	346.36	19.55				
<i>F. alocis</i>	Supragingival plaque	76.51	242.87	17.73	0.426	0.380	0.570	0.360
	Subgingival plaque	1.35	4.48	14.82				
	Whole plaque	248.11	457.73	18.45				
<i>P. endodontalis</i>	Supragingival plaque	484.19	910.22	14.27	0.018*	0.300	0.230	0.616*
	Subgingival plaque	136.81	195.84	13.09				
	Whole plaque	1,952.67	1,691.22	23.64				
<i>T. socranskii</i>	Supragingival plaque	5,958.57	15,831.10	14.73	0.300	-	0.250	0.180
	Subgingival plaque	11,027.74	22,043.40	15.64				
	Whole plaque	2,594.65	1,876.17	20.64				

*by Kruskal-Wallis test

^aSpearman's rank correlation coefficient between subgingival plaque and supragingival plaque

^bSpearman's rank correlation coefficient between subgingival plaque and whole plaque

^cSpearman's rank correlation coefficient between supragingival plaque and whole plaque

Statistical significance at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

총괄 및 고안

본 연구는 구강 내 세균 연구를 위한 세균 채취법을 표준화하기 위한 예비 연구로서 기존 연구에서 제시된 몇 가지 치면세균막 채취법의 세균량과 세균의 다양성을 분석하여 구강 세균 채취법을 비교하였다.

구강 세균 분석을 위해 대표적인 치주질환과 연관된 10가지 세균을 분석하였으며 세균 분류는 Socransky 분류 방법에 따라 Red complex, Orange complex 등으로 분류하였다[22]. 대상자들에게 기존 연구에서 소개되었던 방법들로 세균을 채취하여 세균 다양성과 세균량을 분석한 결과[14], 세균의 다양성에 있어서는 큰 차이를 보이지 않았으며 일부 세균의 양에 있어서는 통계적 유의한 차이가 있었다. 또한 전체 치면을 면봉으로 사용하는 방법이 제시되지 않아 본 연구의 전체 치면을 면봉으로 문지르는 채취법의 분석 결과가 의미있다고 사료된다. 특히 *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, 그리고 *F. nucleatum*은 모든 대상자의 채취 부위에서 관찰되지 않았다. 이러한 차이는 세균의 치주질환 기전(mechanism)과 연관되어 시기 및 방법이 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. *A. actinomycetemcomitans*는 치주염의 주요 원인 세균이라기보다는 숙주 방어를 억제함으로써 세균 간 구성에 영향을 미친다고 알려졌고 구강 내에서 아주 소량 검출된다고 보고 되었다[15]. 본 연구 참여자들이 치주염에 걸리지 않았으며 전신질환 역시 걸리지 않아서 검출되지 않았을 것으로 추측한다. 그리고 *P. intermedia*는 일차 치주염이 진행된 후에 2차적으로 군집을 형성하는 미생물로서 숙주의 면역반응을 조절한다고 알려져 있다[16]. 따라서 본 연구에서는 대상자가 치주염에 이환되지 않은 자이므로 *P. intermedia*가 검출되지 않으리라고 생각한다. 뿐만아니라 *F. nucleatum*은 치주질환이 있는 전신 질환자에게 영향을 미치는 매개 세균으로 알려졌으며 동맥경화, 뇌졸중, 장 질환, 암이 있는 환자에서 특히 발견율이 높았다[17]. 다만 본 연구대상자는 치주질환 및 전신질환에 이환되지 않아 *F. nucleatum* 등이 발견되지 않았을 것으로 생각한다.

*T. forsythia*와 *P. gingivalis*는 치은연상 치면세균막 내에 세균량과 치은연하 및 전체 치면의 치면세균막 내에 세균량과의 연관성도 통계적으로 유의하게 나타났다. *T. denticola* 역시 치은연상과 전체 치면 치면세균막, 그리고 전체 치면과 치은연하 치면세균막 내에 세균량의 연관성이 통계적으로 유의하게 나타났다. *T. denticola*와 *P. gingivalis*는 Red complex로서 세균 집락과 밀접하게 연관된 것으로 추측할 수 있다[18].

치면세균막 내 세균량은 전체 치면을 문지르는 방법이 가장 많이 사용되었으며 특히 *P. gingivalis*, *T. denticola*, 그리고 *P. micra* 등의 세균들이 가장 많이 조사되었다. 구강 내 세균 연구는 치주치료, 구강보건교육 및 약물치료 등의 중재 후의 변화를 살펴보는 경우가 많다. 이러한 연구 및 임상적인 효과를 확인하기 위해서는 채취 방법의 편이성과 미생물 검출의 다양성을 확인하기 위해 전체 치면을 면봉으로 채취하는 방법이 유용하다고 생각한다. 다만, 본 예비 연구에서는 전체 치면을 문지르는 방법이 다른 2가지 방법보다 평균 순위가 가장 높고, 세균의 평균 양도 많아 그 경향성을 확인할 수는 있었다. 하지만, 적은 표본 수로 통계적으로 유의하지 않았다.

구강 내 세균 채취 부위는 치은연하 치면세균막과 치은연상 치면세균막 그리고 타액 등인데, 치료법과 치료 목적에 맞는 부위에서 검체를 채취해야 한다. 다르게 한다면, 혼란스러울 뿐만 아니라 정확한 채취도 어렵다. 이러한 중요성을 볼 때 본 연구에서 수행한 방법별 채취된 세균량과 다양성을 비교하는 것은 의미가 있다고 생각한다. 선행연구에 따르면, 성인의 치은열구, 변연치은, 그리고 타액의 세균총은 채취 부위에 따라 항생제 감수성에 차이가 있으므로 세 부위 모두에서 검체를 채취하여 적절한 항생제를 제시하여야 한다고 주장하였다[23]. 반면에 적절한 항생제 투약을 위한 부위별 세균총의 변화를 분석한 추가적인 연구에서는 치은연하부위, 치은연상부위, 그리고 타액에서의 세균총의 변화를 크지 않아서 가장 용이한 방법인 타액의 세균총을 검사를 통해 항생제 감수성을 확인할 수 있다고 보고하였다[24]. 구강 미생물 채취법을 제시하기 위해서는 부위별 검체의 세균총 변화를 확인하는 것이 중요할 뿐만 아니라 검체 채취의 안전성과 용이성을 비교하여 제시할 필요성이 있다.

특히, 표본채취에 있어서 중요하게 고려할 점은 샘플 채취 시에 치은 및 점막조직의 손상을 최소화 하는 것이며 검체기구의 작동에 의한 치은연하 미생물 감염 및 오염을 최소화 해야 하는 것이다[14]. 구강 내 치은연상 부위 및 점막에 적용하는 면봉법은 비침습적이며 아주 쉽게 활용할 수 있는 방법이라고 제시하였다[14]. 다만 선행연구에서는 다양한 검체 채취법을 제시한 반면 방법별로 개체의 구강 세균총을 비교하진 않았으므로 본 연구를 통하여 분석한 점에서 의의가 있다고 생각한다. 다른 연구에 의하면 소아 환자에서는 치은열구와 변연치은에서 각각 채취했을 경우 부위에 따른 변화는 보이지 않았다고 강조하면서 치은열구, 변연치은이 서로 밀접하기 때문이라고 하였다. 검체 채취를 위한 부위 중 치은열구보다는 변연치은 내지는 치은연상 치면세균막 채취 방법에 대한 효용성을 강조하였다[24].

구강세균의 변화를 확인하기 위해 타액 채취 방법도 추천되고 있으나 타액은 여러 가지 변수에 의해 다양하게 변하기 때문에 치주질환 유발 세균의 다양성과 양을 비교하는 데는 한계가 있다고 보고되었다[25]. 따라서 타액보다 신뢰도, 정확도 그리고 용이성이 높은 면봉법을 추천한다.

본 연구는 구강세균 분석을 위한 채취 방법 중 적절한 방법을 제안하기 위해 기존 다양한 방법들을 비교하여 구강 전체를 면봉으로 문지르는

방법이 세균의 다양성과 세균량에 유의한 방법으로 제안한다. 다만 본 연구는 다음과 같은 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째 구강 내 세균 분석을 위해 10가지 주요 세균만을 분석했다. 따라서 향후 구강 내 전체 세균을 분석하는 광범위한 연구가 필요하다. 둘째 연구대상자의 구강건강 상태, 구강관리능력, 타액의 분비량 및 성분 등 구강 내 세균에 영향을 미칠 수 있는 요인을 미리 고려하지 못하였다. 다만 전체 연구대상자가 흡연하지 않으며 전신질환과 치주염에 이환되지 않은 사람으로 제한하여 최소한의 대상자를 연구하여 신뢰성이 높았다. 셋째, 연구대상자를 편의추출하여 일반화하기 어려운 제한점이 있다. 하지만 본 연구는 구강 세균채취법을 제안하기 위해 기존 연구들에서 사용된 방법에서 미생물의 다양성과 양을 비교하여 적절한 방법을 제안한 점에서 의의가 있다고 사료된다. 추후 다양한 전신질환 유무와 구강건강 상태와 타액 분비량 등을 종합적으로 고려하여 연구해야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 본 연구는 19세 이상 11명을 대상으로 구강세균 채취법에 따른 다양성과 양을 비교 연구하여 추후 구강 세균총 연구를 하기 위한 예비연구로서 중요한 결과를 얻었다.

1. *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*은 모든 피험자의 치은연하 치면세균막에서 관찰되지 않았다.
2. *P. gingivalis*의 경우, 치은연상 치면세균막, 치은연하 치면세균막, 전체 치면의 치면세균막 사이에 유의한 상관관계가 관찰되었다.
3. 큐렛을 사용한 치은연상 치면세균막 채취법 및 치은연하 치면세균막 채취법과 비교하여 면봉법을 사용한 전체 치면세균막 채취법이 세균량이 가장 많았다.

이상의 결과를 바탕으로 면봉을 사용한 전체 치면세균막 채취법을 구강세균 채취법으로 제시할 수 있겠다. 향후 다양한 전신질환 유무와 구강건강 상태에 따른 미생물 변화와 함께 채취법에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Notes

Author Contributions

Conceptualization: HS Shin, SJ Sim, JH Kim; Data collection: SJ Sim, JH Kim; Formal analysis: SJ Sim, HS Shin; Writing-original draft: HS Shin, SJ Sim, JH Kim; Writing-review&editing: HS Shin, SJ Sim, JH Kim

Conflicts of Interest

The authors declared no conflicts of interest.

Funding

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF -2022R111A1A01066197).

Ethical Statement

This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of Baekseok University (BUIRB-202305- HR-011).

Acknowledgements

None.

References

1. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral bacteria. *Arch Microbiol* 2018;200(4):525-40. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
2. Wade WG. The oral bacteria in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69(1):137-43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
3. Xiao E, Mattos M, Vieira GHA, Chen S, Corrêa JD, Wu Y, et al. Diabetes enhances IL-17 expression and alters the oral bacteria to increase its pathogenicity. *Cell Host Microbe* 2017;22(1):120-8.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.014>
4. Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol 2000* 2020;83(1):90-106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>
5. Fan X, Alekseyenko AV, Wu J, Peters BA, Jacobs EJ, Gapstur SM, et al. Human oral bacteria and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut* 2018;67(1):120-7. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312580>
6. Ryder MI. *Porphyromonas gingivalis* and Alzheimer disease: recent findings and potential therapies. *J Periodontol* 2020;91(Suppl 1):S45-s9. <https://doi.org/10.1002/jper.20-0104>
7. Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The oral microbiota is modified by systemic diseases. *J Dent Res* 2019;98(2):148-56. <https://doi.org/10.1177/0022034518805739>
8. Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000* 2018;76(1):116-30. <https://doi.org/10.1111/prd.12150>
9. Ko Y, Lee EM, Park JC, Gu MB, Bak S, Ji S. Salivary microbiota in periodontal health and disease and their changes following nonsurgical periodontal treatment. *J Periodontal Implant Sci* 2020;50(3):171-82. <https://doi.org/10.5051/jpis.2020.50.3.171>
10. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* 2019;42(1):27-35. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
11. Salhi L, Rompen E, Sakalihan N, Laleman I, Teughels W, Michel JB, et al. Can periodontitis influence the progression of abdominal aortic aneurysm? a systematic review. *Angiology* 2019;70(6):479-91. <https://doi.org/10.1177/0003319718821243>
12. Hussein H. Oral sampling techniques. New York: Humana; 2021: 17-29.
13. Lu H, Zhao Y, Feng X, He L, Meng H. Bacteria in maintained periodontitis and its shift over a single maintenance interval of 3 months. *J Clin Periodontol* 2019;46(11):1094-104. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13177>
14. Lu H, Zou P, Zhang Y, Zhang Q, Chen Z, Chen F. The sampling strategy of oral bacteria. *iMeta* 2022;1(2):e23. <https://doi.org/10.1002/imt2.23>
15. Nørskov-Lauritsen N, Claesson R, Birkeholm Jensen A, Åberg CH, Haubek D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: clinical significance of a pathobiont subjected to ample changes in classification and nomenclature. *Pathogens* 2019;8(4):243-61. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040243>
16. Dayakar MM, Bhat S, Lakshmi KNB. *Prevotella intermedia*-An overview and its role in periodontitis. *J Adv Clin Res Insights* 2021;8(4):79-82.
17. Fan Z, Tang P, Li C, Yang Q, Xu Y, Su C, et al. *Fusobacterium nucleatum* and its associated systemic diseases: epidemiologic studies and possible mechanisms. *J Oral Microbiol* 2023;15(1):2145729. <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2145729>
18. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol* 2008;79(4):670-6. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070398>
19. Aja E, Mangar M, Fletcher HM, Mishra A. Filifactor aloicis: recent insights and advances. *J Dent Res* 2021;100(8):790-7. <https://doi.org/10.1177/00220345211000656>
20. Na HS, Kim SY, Han H, Kim HJ, Lee JY, Lee JH, et al. Identification of potential oral microbial biomarkers for the diagnosis of periodontitis. *J Clin Med* 2020;9(5):1549. <https://doi.org/10.3390/jcm9051549>
21. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001;72(10):1354-63. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.10.1354>
22. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
23. Drucker DB, Jolly M. Sensitivity of oral micro-organisms to antibiotics. *Br Dent J* 1971;131(10):442-4. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4802771>
24. Shin SH, Kim BK, Song JH, Park SH, Chung IK. Antimicrobial susceptibility test on oral flora from different sampling sites in children. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 2000;26(1):40-4.

25. Jiang Y, Song B, Brandt BW, Cheng L, Zhou X, Exterkate RAM, et al. Comparison of red-complex B bacteria between saliva and subgingival plaque of periodontitis patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:727732. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.727732>