

Trabajos Originales:

RASTREO GENÉTICO DEL *Streptococcus mutans*

**Eduvigis Solórzano (1), Nancy Díaz (1), Andrea Smerling (2), Rafael Montiel (3),
Assumpció Malgosa (4).**

1. Profesora titular, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona, España
2. Odontóloga, Universitat de Barcelona. Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
3. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV-IPN, Irapuato, México.
4. Unitat d'Antropologia, Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia, Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Dirección postal: Calle 24, entre Avenidas 2 y 3, Edificio del Rectorado, Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Estado Mérida. Venezuela. c/p 5101.
Teléfono-fax: 0058 274-2402383
Correo-e: eduvigis@ula.ve

Resumen:

Las técnicas moleculares para recuperar DNA antiguo brindan la posibilidad de comparar la evolución molecular a través del tiempo, ya que constituye una herramienta para aclarar el diagnóstico de posibles enfermedades infecciosas del pasado. **Objetivo:** Aislar y secuenciar un fragmento de DNA de *Streptococcus mutans* fosilizado, considerado el principal agente infeccioso implicado en la formación de la placa bacteriana y el desarrollo de la caries dental, utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). **Metodología:** La muestra estuvo conformada por caries y tártaro dental proveniente de dientes de diferentes colecciones de México, Barcelona e Islas Baleares. La metodología fue adaptada a las condiciones de conservación de este tipo de muestra para obtener DNA y los *primers* fueron específicos para la amplificación de un fragmento de 124 pb del gen de la Dextranasa del *S. mutans*. **Resultados:** De las 24 muestras analizadas, 9 resultaron positivas para la amplificación y en 6 se lograron las secuencias correspondientes. Para la alineación de las secuencias obtenidas, se empleó la base de datos BLAST encontrándose una homología del 95% con el genoma del *S. mutans* UA159. **Conclusión:** Este estudio demuestra la primera evidencia de obtención de la secuencia de un fragmento de DNA de *Streptococcus mutans* recuperados a partir de caries y cálculo dental de restos humanos antiguos, presentando un 95% de homología con el DNA de *S. mutans* de la subespecie UA159 moderno.

Palabras claves: *Streptococcus mutans*, DNA antiguo, Reacción en Cadena de Polimerasa.

Abstract:

The molecular techniques for ancient DNA recovering, offers the possibility to compare the molecular evolution through time as these are tools which make clear possible infectious diseases from the ancient times **Objective:** To isolate and sequence fossilized *Streptococcus mutans* DNA fragments, considered the infectious agent involved with dental caries and plaque formation and development, by using the polymerase chain reaction (PCR). **Subjects and methods:** Dental caries and tartar samples of teeth collections from Mexico, Barcelona and Balearic Islands. The methodology was adapted to the

conservation conditions of this type of DNA samples, and *primers* were specific to amplify a fragment of 124 bp of *S. mutans* dextranase gene. Results: 24 samples were analyzed, 9 were positive for amplification and 6 were obtained with its corresponding sequences. To alignment the sequences obtained, we used the BLAST database, giving us the 95% homology with the *S. mutans* UA159 genome. **Conclusion:** This study shows us the first evidence of *Streptococcus mutans* DNA sequence fragment recovered from dental caries and tartar from ancient human remains, presenting a 95% homology with *S. mutans* UA159 modern subspecies DNA.

Key words: *Streptococcus mutans*, ancient DNA, polymerase chain reaction.

Introducción:

La paleopatología es la especialidad médica que investiga la evolución y el progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo (sin precisar un periodo en particular) y de cómo la humanidad se ha ido adaptando a los cambios de su entorno (1, 2). La importancia de conocer las enfermedades en el pasado, la morbilidad, el impacto en el ecosistema y los cambios evolutivos hasta llegar a la patología actual sustentan el interés por investigarlo (3). Siguiendo la misma línea, la paleodontología o paleoestomatología abarca el estudio de las estructuras, funciones y enfermedades del aparato estomatognático a partir de restos humanos antiguos (4). Los dientes y sus huesos de soporte proporcionan gran cantidad de información debido a su dureza; esto favorece que su conservación pueda resistir con ventaja sobre el resto del esqueleto, siendo frecuentemente, el registro fósil más abundantes. De hecho, la proporción de restos dentales y fragmentos óseos mandibulares en relación a otros restos óseos, aumenta en relación a la antigüedad de la muestra (2, 3, 5).

La importancia del estudio de las diferentes lesiones asociadas a los dientes, radica no sólo en el conocimiento de la salud buco-dental de una población en particular, sino en la fuente de información que representa para el conocimiento de la dieta y hábitos existentes tanto en las poblaciones actuales como en antiguas (5).

La caries es la más común de las enfermedades dentales y en relación a las poblaciones arqueológicas es la patología más frecuencia entre las lesiones buco-dentales (2). Otras alteraciones comúnmente descritas son los depósitos de sales cálcicas a nivel cervical y en algunas porciones de las coronas dentarias, producto de la mineralización de la placa bacteriana. Su presencia se constata en todas las épocas (3, 6, 7, 8) e indudablemente, influye en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Estudiar el desarrollo de las enfermedades infecciosas bucales a través del tiempo mediante la observación de la caries, el cálculo dental y su relación con los agentes microbianos que las producen, puede proporcionar una valiosa información respecto al origen de estos procesos y los patrones de subsistencia de los mismos (5).

La paleomicrobiología bucal puede ser estudiada por diferentes técnicas, las cuales muestran la relación agentes infecciosos fosilizados con las enfermedades más prevalentes que han afectado la cavidad bucal desde tiempos pretéritos, como lo son la caries dental y la enfermedad periodontal.

La utilización de la inmunofluorecencia ha permitido la identificación de microorganismos en lesiones infecciosas óseas, como la osteomielitis, producida por blastomicetos o lesiones por *Mycobacterium tuberculosis*. Asimismo, se han utilizado sueros monoclonales y policlonales para la determinación de especificidad de reacciones en estudios esencialmente paleopatológicos (5).

En trabajos realizados con cálculo dental de individuos proveniente de la cultura Natufiense, se demostró a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta la presencia de *Streptococcus mutans* (serotipo c) fosilizado, que de acuerdo con la hipótesis de placa específica, sería uno de los principales agentes de la caries dental por su acción acidogénica, producto de la fermentación de los hidratos de carbono

(específicamente la sacarosa) (5, 9, 10, 11).

Más recientemente, el análisis de DNA se ha convertido en un método efectivo, versátil y accesible para un numeroso grupo de científicos, lo que ha permitido no sólo la identificación de mapas genéticos y el análisis funcional de los microorganismos, sino que también ha estimulado nuevos campos de aplicación, como es el caso del estudio del DNA antiguo (aDNA).

Actualmente, el reciente desarrollo biotecnológico permite obtener datos de poblaciones antiguas utilizando restos arqueológicos. Este campo de investigación presenta todas las potencialidades para poder contribuir sustancialmente a la comprensión de nuestra historia evolutiva del hombre (12). La capacidad de las biomoléculas, de sobrevivir largos períodos de enterramiento en huesos y dientes, ha permitido el aislamiento de DNA del huésped y del DNA bacteriano con la finalidad esclarecer diferentes enfermedades infecciosas sufridas a lo largo de la historia (13, 14, 15, 16).

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue aislar y secuenciar un fragmento de DNA de *Streptococcus mutans* fosilizado, siendo este integrante del grupo mutans, considerado el principal agente infeccioso implicado en la formación de la placa bacteriana y el desarrollo de la caries dental.

Materiales y Métodos:

Muestra: Las muestras fueron cuidadosamente seleccionadas, diagnosticando la presencia de caries y cálculo dental por observación directa de dientes que forman parte de cuatro colecciones esqueléticas del Laboratorio de la Unidad de Antropología Biológica *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB), España:

- Granollers, Barcelona (España): principios de siglo XX,
- Església San Pere, Terrassa, Barcelona (España): siglos V-XII
- Can Reiners, Islas Baleares (España): siglo VII, colecciones, *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB), España.
- Tlatelolco, Ciudad de México (México): época pre-contacto, siglo XV - principios del siglo XVI.
- Los Olmos, Hidalgo (México): época post-contacto, siglo XVI.

Un total de 24 muestras con caries y cálculo dental fueron seleccionadas, tomando en consideración que los microorganismos del grupo *S. mutans*, se asocian con el desarrollo inicial de lesiones de esmalte, invaden túbulos dentinarios, son altamente cariogénicos, y forman parte de la constitución del cálculo dental (9, 17).

Método: Según criterios de autenticidad descritos por Montiel et al. (2007), el trabajo de laboratorio se realizó bajo estrictas medidas de esterilización, para evitar la contaminación durante los procesos de extracción y PCR garantizando la confiabilidad de los resultados. Los procesos fueron realizados para pre-PCR y post-PCR, para la preparación de los reactivos se emplearon soluciones estériles e instrumental de vidrio, siendo todo el material autoclavado dos veces e irradiado con rayos UV (254nm) antes de su utilización. El trabajo en el laboratorio se realizó utilizando indumentaria estéril, mascarillas y guantes desechables que se fueron cambiando frecuentemente en los diferentes pasos durante todo el proceso. Un control de extracción fue siempre incluido en el procesamiento de las muestras (KE) y un control adicional en cada PCR (K-) (18).

Extracción y precipitación de DNA: Las extracciones se realizaron en grupos de 3 a 5 muestras, incluyendo el KE. Antes de comenzar cada extracción se realizaba un rápido lavado de los dientes con

solución de hipoclorito de sodio al 10%. Para la obtención de caries se utilizó un juego de instrumental diferente para cada muestra, previamente esterilizado y autoclavado, el cual contenía un fórceps, una pinza de algodón y fresas redondas de diamante para instrumental rotatorio y para la obtención del cálculo dental se utilizando raspadores estériles (Fig.1a y 1b).

El material obtenido se recolectaba directamente en tubos de 15 ml. y sometido a digestión enzimática con 0.1mg/ml de proteinasa K, en tampón de extracción (EDTA 0.5M pH 8, Tris-HCl 1M pH 8.0-8.5, SDS al 10%), incubándolo a 37° C durante toda la noche. La extracción de DNA se realizó con fenol/cloroformo y la purificación y concentración se llevó a cabo con centrífuga 30 (Millipore®). Los extractos de DNA en suspensión se almacenaron a 4° C durante 3 días con la finalidad de minimizar los efectos de los inhibidores de la PCR (19).

En algunas de las muestras se realizó un lavado con EDTA previo a la colocación del tampón, con la finalidad de facilitar la desmineralización del tejido. Este paso consiste en agregar 5 ml de EDTA 0,5M al tubo que contiene la muestra, centrifugar por 5 minutos a 3.500 rpm, decantar el sobrenadante, repetir el paso anterior y finalmente agregar el tampón para la correspondiente digestión enzimática.

Identificación del agente patógeno: El DNA fue amplificado mediante PCR con primers específicos para *Streptococcus mutans*, diseñados en el laboratorio de la UAB, utilizando en cada reacción, un control negativo de amplificación (K). Los *primers* amplifican un segmento de 124 pares de bases (pb) del gen de la Dextranasa del *S. mutans*, entre las posiciones 344 - 467. La posibilidad de que los *primers* hibridaran con secuencias de otras especies, fue verificada mediante el programa BLASTN 2.2.7 (Jan-02-2004) en el GenBank (20).

Primers:

F: 3'-CGGCTGAACCAGCTATTAGG-5'

R: 3'-GACGCCGATTCTGTCTGTAC-5'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl conteniendo: 10 mm de tampón 10X (tris HCl pH 9,0), 2 mm de Mg2Cl, 200 µm de cada dNTP's, 50 pmol de cada primer, 160 mg/ml de BSA, 2 U de Taq ADN polimerasa, y 1 o 2 µl de DNA en suspensión. El programa del termociclador consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94° C, 39 ciclos de 50 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto a 55° C, temperatura de annealing, y 1 minuto de extensión a 72° C, terminando con un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72° C, finalizando el proceso a 4° C. Finalmente, los productos amplificados de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa estándar al 3% y visualizado a través de UV.

El producto amplificado y purificado se sometió a la reacción de secuenciación en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Microbiología de la UAB, utilizando un secuenciador automático Alf-express (Pharmacia). Las secuencias se visualizaron con el programa Chromas v1.45 y se alinearon, verificándose manualmente, con la base de datos del GenBank (NCBI), utilizando el programa BLAST (20), para comparar secuencias.

Resultados:

De las 24 muestras analizadas, 9 dieron resultados positivos para la amplificación y en 6 se lograron las secuencias correspondientes (Fig. 2). Estas secuencias se compararon con las secuencias del genoma de *S. mutans*, publicada en el BLAST de la subespecie UA159 que se ha determinado como la principal causante de la caries dental, encontrándose una homología de un 95% (Fig. 3).

Figura 1
Obtención de la muestra: (1a) a partir de caries dental
(1b) a partir de cálculo dental.

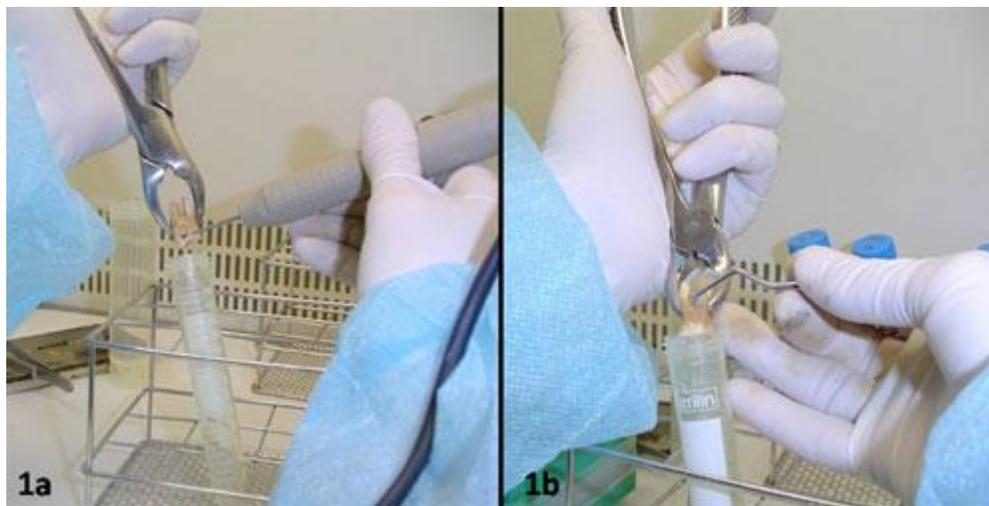


Figura 2
Gel de Agarosa al 3% para comprobar los fragmentos de 124 pb de *S. mutans*.
Marcador de peso molecular= M123 pb. Muestras= Sm5, Sm6. Control de Extracción= KE. Control de amplificación= K-.

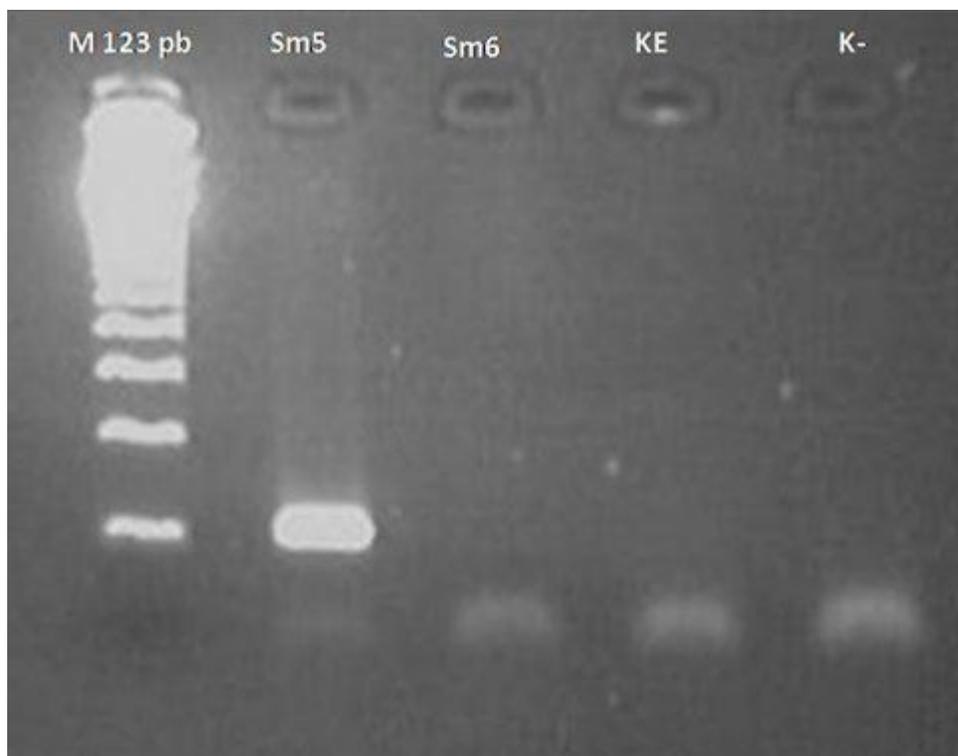
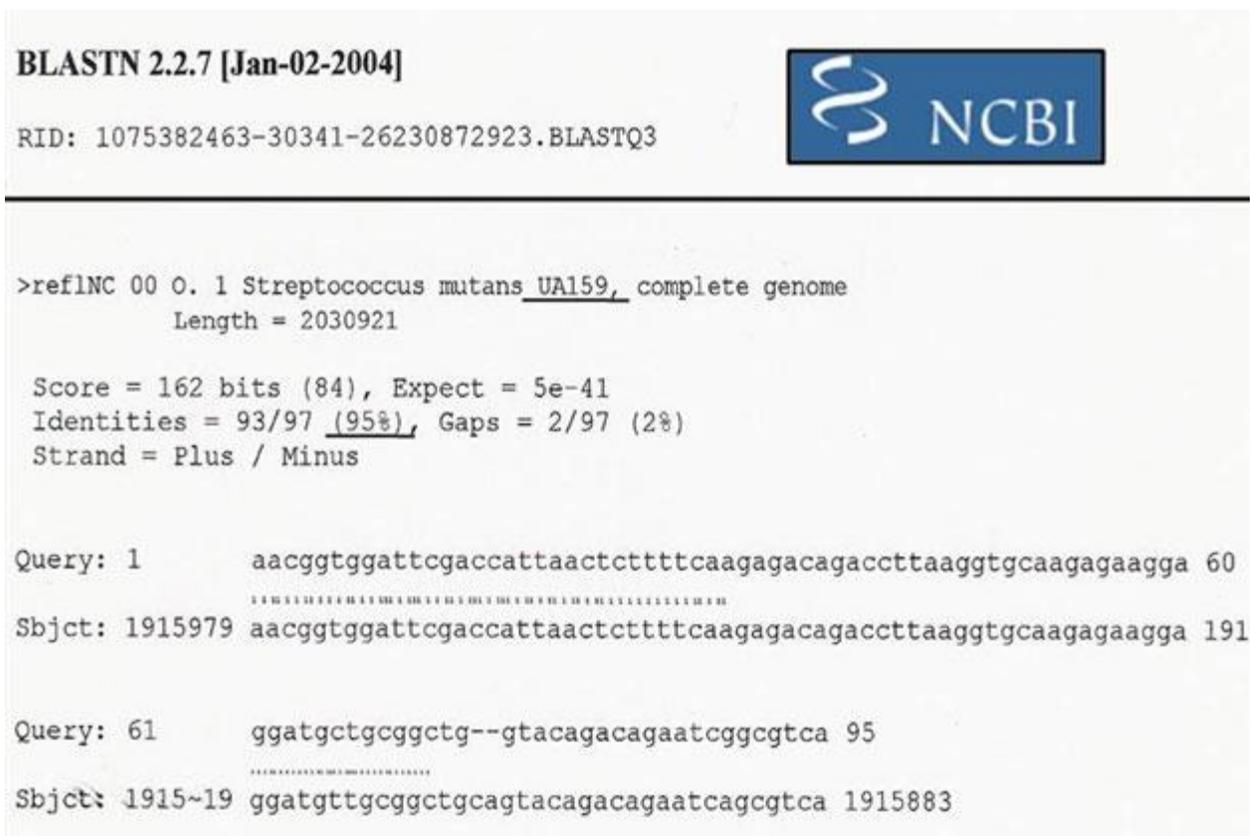


Figura 3
Comparación de una de las secuencias obtenidas (Sm5) con la secuencia del *S. mutans* UA159, publicadas en la base de datos BLAST. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi



Discusión:

La identificación molecular del *S. mutans* se fundamentó en diferentes estudios que han demostrado la posibilidad de recuperar material genético antiguo de organismos patógenos con suficiente calidad y cantidad, utilizando primers que amplifiquen fragmentos pequeños de DNA de entre 100 y 200 pb (21, 22). Asimismo, es importante destacar que hasta la fecha no se ha encontrado en la literatura, ninguna prueba experimental que especifique la obtención de secuencias de DNA proveniente de bacterias de la cavidad bucal en restos antiguos.

Numerosas referencias relacionadas con la caries, incluyendo las primeras teorías que intentan explicar su etiología, se han encontrado en la historia registrada de los pueblos antiguos, pero la idea de que ácido + microorganismos, estaban involucrados en la etiología de la caries no surgió sino hasta 1889, cuando Miller promueve su "teoría quimioparasitaria", constituyendo luego la columna vertebral del conocimiento y comprensión actual de la etiología de la caries dental (23, 24, 25). La hipótesis de que las bacterias son un prerrequisito para la iniciación y avance de la caries y la especificidad de los microorganismos en la iniciación de la misma, fue confirmada por Orland et al. (1954-1955) y más tarde, Fitzgerald y Keyes (1960), enunciaron que el factor bacteriano transmisible en la caries era un estreptococo, más tarde identificado como *Streptococcus mutans* (23, 24, 25).

De todas las bacterias bucales, los estreptococos han sido los más estudiados. Actualmente, es indiscutible el rol del *Streptococcus mutans* en el inicio y avance de la caries dental (8, 9, 10, 26, 27). La capacidad para producir y resistir ácidos, la formación y utilización de los polisacáridos de almacenamiento y la formación de glucanos extracelulares a partir de la sacarosa, dan a este microorganismo características determinantes de su cariogenicidad (24).

El *Streptococcus mutans* se encuentra casi exclusivamente en la cavidad bucal humana. Si bien está perfectamente documentado el hecho de que ciertos animales salvajes y de laboratorio hospedan microorganismos fenotípicamente similares al *S. mutans* que se encuentra en los humanos, existen diferencias genotípicas entre ambos tipos. Por otra parte, la presencia del *S. mutans* en el hábitat bucal específico, viene determinado por las interacciones físicas, de adherencia y nutricionales que no permite la subsistencia de este microorganismo en un medio habitual que no sea la cavidad bucal (23, 24, 25).

Los primers utilizados fueron diseñados especialmente para este trabajo en el Laboratorio de ADN antiguo de la UAB, a partir del gen de la dextranasa de *Streptococcus mutans*. Se trata de un fragmento de 124 pb que amplifican la región 344-467 dentro de la secuencia completa del gen de la dextranasa (*Streptococcus mutans dexA gene for dextranase, complete cds. ACCESSION D49430*).

Estudios con diferentes propósitos han demostrado la efectividad de la obtención de DNA de *S. mutans* en muestras actuales, utilizando primers que amplifican fragmentos del gen de la dextranasa (28, 29). La molécula de dextranasa está constituida por un péptido (Sp), una región estable (CR) y dos regiones variables (nVR y cVR). La región estable es la responsable de la actividad enzimática y se observa homología de esta región con el resto de Streptococci (*S. dowenei*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, entre otros) (29).

Análisis basados en la comparación de secuencias nucleotídicas de Dex pertenecientes a diferentes especies de estreptococos, han demostrado que la región estable presenta homología entre las mismas. En contraste, las regiones variables no presentan homología, el tamaño de nVR y cVR es diferente entre las especies y no son funcionalmente importantes (28, 29). Por otra parte, la constitución de la dextranasa entre las distintas especies es diferente, por lo cual, el producto amplificado en este estudio resulta de la hibridación de los primers con el DNA de *Streptococcus mutans*, descartando toda posibilidad de amplificación con otro microorganismo, ni con otra especie bacteriana.

La región amplificada no presenta homologías significativas con secuencias de ninguna otra especie, según análisis con el programa BLASTN 2.2.7 (Jan-02-2004), en el GenBank (20). Además, en este gen, aparentemente, no existen dominios conservados, según análisis con el programa ORF Finder del NCBI Genbank (30). Asimismo, es necesario destacar que nunca antes se había trabajado con este microorganismo en el Laboratorio de aDNA de la UAB, por lo tanto, no cabe duda que el DNA recuperado de *S. mutans* se encontraba en la caries y cálculo dental de las muestras analizadas.

Conclusión:

Este estudio demuestra la primera evidencia de obtención de la secuencia de un fragmento de DNA de *Streptococcus mutans* recuperados a partir de caries y cálculo dental de restos humanos antiguos, que presenta 95% de homología con el DNA de *S. mutans* de la subespecie UA159 moderno.

Bibliografía:

1. Chimenos, E.: Estudio paleoestomatológico de poblaciones prehistóricas de Catalunya. Zaragoza. Libros Pónticos. 1990.
2. Roberts, Ch.; Manchester, K.: Arqueología de la enfermedad. Madrid. Jarpo Ed. 2000.

3. Campillo, D.: Paleopatología. Los primeros vestigios de la enfermedad. Barcelona. Fundación Uriach. 1993.
4. Isidro, A.; Malgosa, A.: Paleopatología. La enfermedad no escrita. Barcelona. Editorial Masson. 2003.
5. Perea, B.; Sanchez, Ja.; Dominguez, S.: Antropología y paleontología dentarias. Madrid. Ed. Mapfre. 2002.
6. Chimenos, E.; Martinez, A.: Antecedentes prehistóricos de la enfermedad periodontal. Avances en periodoncia. 1990; 2 (3): 149-154.
7. Chimenos, E.; Callejas, J.: Perspectiva evolutiva del cálculo dental. Anales de Odontoestomatología. 1998; 5 (1): 25-33.
8. Linossier, A.; Gajardo, M.; Olavarria, J.: Paleomicrobiological study in dental calculus: *Streptococcus mutans*. Scanning Microscopy. 1996; 10 (4): 1005-1014.
9. Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H.; Ginsberg, H.: Tratado de Microbiología. 4ª edición. Barcelona. Editorial Masson. 1996.
10. Aguilera, A.; Estrada, I. Detección de una secuencia del gene spaP de *Streptococcus mutans* en muestras de placa dental mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - Revista de la Asociación Dental Mexicana. 2003; 60 (5): 180-184.
11. Oho, T.; Yamashita, Y.; Shimazaki, Y.; Kushiya, M.; Koga, T.: Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiology Immunology. 200; 15(4): 258-262.
12. Martinez-Labarga, C.; Rickards, O.: La utilización del DNA antiguo en la investigación de la historia evolutiva humana. Revista Española de Antropología. 1999; 20: 195-213.
13. Zink, AR.; Sola, C.; Reischl, U.; Grabner, W.; Rastogi, N.; Wolf, H.; Nerlich, AG.: Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41 (1): 359-367.
14. Baron H.; Hummel S.; Herrmann B. Mycobacterium tuberculosis Complex DNA in Ancient Human Bones. Journal of Archaeological Science. 1996; 23: 667-671.
15. Zink, A.; Haas, CJ.; Reischl, U.; Szeimies, U.; Nerlich, AG.: Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. Journal of Medical Microbiology. 2001; 50(4): 355-366.
16. Youstena, A.; Ripperea, K.: DNA similarity analysis of a putative ancient bacterial isolate obtained from amber. FEMS Microbiology Letters. 1997; 152 (2): 345-347.
17. LINDHE J.: Periodontología clínica e implantología odontológica. 4ª Edición. Madrid. Ed. Panamericana. 2006.
18. Montiel R, Malgosa A, Francalacci P. Authenticating ancient human mitochondrial DNA. Human Biology. 2001; 73(5):689-713.

19. Montiel R, Malgosa A, Subirà E. Overcoming PCR inhibitors in ancient DNA extracts from teeth. *Journal Ancient Biomolecules*. 1997; 1:221-225.
20. www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
21. Montiel, R.; García, C.; Cañadas, M.; Isidro, A.; Guijo, J.; Malgosa, A.: 2003. DNA sequences of *Micobacterium leprae* recovered from ancient bones. *FEMS Microbiology Letters*. 226 (2): 413-414.
22. Solórzano E, Díaz N, Montiel R, Cañadas MP, Isidro A, Malgosa A.: Análisis molecular de casos de treponematosi congénita en individuos neonatales del siglo XVI (Huelva-España). Oviedo. En: Egocheaga JE. *Biología de las poblaciones humanas: Diversidad, tiempo, espacio* Eds. XIII Congreso de la Sociedad Española de Antropología Biológica. 2004.
23. Thylstrup, A.; Fejerskov, O.: *Caries*. Barcelona. Editorial Doyma. 1988.
24. Menaker, L.: *Bases Biológicas de la Caries Dental*. Barcelona. Editorial Salvat. 1986.
25. Nikiforuk, G.: *Caries Dental*. Buenos Aires. Editorial Mundi. 1986.
26. Redmo Emanuelsson, IM.; Carlsson, P.; Hamberg, K.; Bratthall. D.: Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiology Immunology*. 2003; 18(1): 24-29.
27. Sato, T.; Hu J.; Ohki K.; Yamaura M.; Washio J.; Matsuyama J.; Takahashi N.: Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. *Oral microbiology Immunology*. 2003; 18(5): 323-326.
28. Morisaki, H.; Igarashi, T.; Yamamoto, A.; Goto, N.: Analysis of dextran-binding domain of the dextranase of *Streptococcus mutans*. *Letters in Applied Microbiology*. 2002; 35 (3): 223-227.
29. Igarashi T.; Yamamoto A.; Goto N. Nucleotide Sequence and Molecular Characterization of a Dextranase Gene from *Streptococcus downei*. *Microbiology and Immunology*. 2001; 45 (5): 341-348.
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>