

Investigação

Prevalência da cárie dentária e presença de bactérias cariogénicas no dorso lingual – Estudo seccional cruzado

João Galrão ^{a,*}, Luís Proença ^b e Helena Barroso ^c

^a Mestre em Medicina Dentária, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal

^b Professor Associado, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; Centro de Ciências Moleculares e Materiais, Faculdade de Ciências de Lisboa, Lisboa, Portugal

^c Professora Associada, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; URIA-CPM, Faculdade de Farmácia de Lisboa, Lisboa, Portugal

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Recebido a 20 de janeiro de 2011

Aceite a 19 de novembro de 2011

On-line a 4 de janeiro de 2012

Palavras-chave:

Dorso lingual

Microrganismos

Índice CPO-D

Streptococcus mutans

Lactobacillus spp.

RESUMO

Objetivos: Pesquisa e quantificação de microrganismos no dorso lingual de indivíduos com alto e baixo índice de CPO-D.

Materiais e métodos: O estudo efetuado envolveu 50 indivíduos, avaliados quanto aos seus índices de CPO-D, por meio de um exame clínico, separados em dois grupos, alto índice de cárie e baixo índice de cárie, de 25 elementos cada. Em cada indivíduo foi pesquisada a presença de microrganismos no dorso da língua, recorrendo a meios de cultura específicos (Columbia Agar, MSA, MSB e Rogosa Agar). Os microrganismos isolados foram identificados e quantificados. Os resultados obtidos foram alvo de análise estatística inferencial.

Resultados: Os resultados obtidos mostraram uma relação positiva entre os valores dos *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus spp* com indivíduos com CPO-D elevados ($p<0,001$).

Conclusão: Os dados obtidos neste estudo demonstram que o dorso lingual é um importante nicho de bactérias, nomeadamente microrganismos cariogénicos.

© 2011 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

Prevalence of dental caries and cariogenic bacteria in tongue dorsum - Cross sectional study

ABSTRACT

Objective: Identification and quantification of microorganisms in the tongue dorsum in subjects with high and low level of DMFT.

Materials and methods: The study involved 50 subjects assessed for their DMFT levels, through a clinical examination, separated into two groups of 25 elements each, being one group a high prevalence of dental caries and the other a low prevalence of dental caries. In each individual the presence of microorganisms in the tongue dorsum was determined, using specific culture media (Columbia Agar, MSA, MSB e Rogosa Agar).

Keywords:

Tongue dorsum

Microorganisms

DMFT

Streptococcus mutans

Lactobacillus spp.

* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: Joaogalrao@netcabo.pt (J. Galrão).

The isolated microorganisms were identified and quantified. Inferential statistical analysis was performed on the experimental data.

Results: The results showed a positive relationship between the values of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* with subjects with a high DMFT ($p<0,001$).

Conclusion: The data from this study demonstrate that the back of the tongue is an important niche of bacteria, including cariogenic microorganisms.

© 2011 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introdução

O dorso da língua representa um dos mais complexos nichos ecológicos humanos, sendo que, aproximadamente um terço dos microrganismos, que habitam a cavidade oral, se encontra só ao nível do dorso lingual¹. A composição bacteriana da superfície lingual é complexa e de difícil caracterização devido ao facto de um indivíduo saudável apresentar em média 100 a 200 espécies diferentes, indicando uma heterogeneidade substancial entre indivíduos². O dorso da língua forma uma zona ecológica única, com as suas criptas e papilas, que providenciam uma superfície ampla favorecendo a acumulação de resíduos orais e de microrganismos. Microbiologicamente, constitui um importante reservatório bacteriano, funcionando assim, como um fator determinante ao nível da colonização da superfície dentária³⁻⁵. As investigações feitas à origem dos microrganismos na saliva, concluem que grande parte desses microrganismos emanam da língua e, em geral, os microrganismos da língua influenciam a flora de toda a cavidade oral⁶.

Apesar da descamação contínua do epitélio da língua, o dorso raramente se apresenta livre de estripes de *Staphylococcus* e de *Streptococcus*. Estes microrganismos podem compor até 90% da massa bacteriana na língua^{1,4,7}.

Dentro da família dos *Streptococcus* é importante realçar o grupo dos *Streptococcus viridans*, que engloba quatro conjuntos filogenéticos: *mitis*, *mutans*, *salivarius* e o grupo *anginosus* ou *milleri*. Algumas dessas bactérias estão implicadas em doenças orais como a cárie e a periodontite, sendo estas as infecções bacterianas mais comuns em humanos⁸.

As principais espécies bacterianas associadas ao desenvolvimento da cárie (bactérias cariogénicas) são *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), e *Lactobacillus spp.*⁹⁻¹². Estas espécies estão intimamente ligadas aos índices de cárie de um indivíduo, apresentando uma associação positiva entre os seus níveis e a alta prevalência de cárries¹³⁻¹⁵.

O *S. mutans* é considerado por alguns autores como sendo um organismo específico das cárries dentárias e constitui uma das bactérias com maior poder cariogénico devido à sua grande capacidade acidogénica^{13,14,16,17}. Habita normalmente nas superfícies dentárias, mas tem sido encontrado noutras nichos, tais como o dorso da língua^{6,18,19}.

Existem à volta de 100 espécies de *Lactobacillus* e algumas dessas espécies habitam várias zonas do nosso organismo, como por exemplo, o trato gastrointestinal e o trato urogenital feminino, onde desempenham um papel importante na saúde geral do hospedeiro, funcionando como microrganismos probióticos. Em contraste, na cavidade oral, estas bactérias estão amplamente implicadas no desenvolvimento

da cárie dentária. Os estudos demonstram que aparecem durante os primeiros anos de vida e estão presentes em elevados números na saliva, dorso da língua, na mucosa oral e palato^{20,21}. O *Lactobacillus*, tal como o *S. mutans*, exibe certos traços cariogénicos, tais como o alto potencial acidogénico, libertando grandes quantidades de ácido láctico, diminuindo o pH do meio até ao ponto de inibir o crescimento de organismos menos ácido tolerantes^{22,23}.

É importante salientar que outras bactérias orais como *Actinomyces israelii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus milleri* e *Veillonella* também possuem algum potencial cariogénico tendo já sido encontradas associadas a lesões de cárie^{16,24}. Os estudos efetuados à flora residente da cavidade oral, concluem que várias bactérias orais, para além do *S. mutans* e dos *Lactobacillus*, são suficientemente acidogénicas para terem efeito cariogénico, ou seja, estas bactérias trabalhando em conjunto e num meio rico em hidratos de carbono, possuem a capacidade de baixarem o pH do meio para níveis críticos de desmineralização do esmalte dos dentes, iniciando assim o processo da cárie, porém a uma taxa mais lenta^{16,25}.

A cárie dentária é a doença com maior prevalência no mundo inteiro, é transmitida logo nos primeiros anos de vida e representa um problema significativo de saúde pública em alguns países. Encontra-se presente em todas as populações do mundo e se não for tratada provoca a destruição dos tecidos duros do dente (esmalte e dentina), sendo a principal razão para a perda de peças dentárias^{23,26-28}.

Com este estudo pretendeu-se identificar quais os microrganismos presentes no dorso lingual em indivíduos com elevado índice de CPO-D e em indivíduos de baixo índice de CPO-D.

Materiais e métodos

Amostragem

Foi efetuado um estudo seccional cruzado que decorreu durante 3 meses (maio, junho e julho).

Este estudo envolveu 50 indivíduos. Estes foram avaliados quanto aos seus níveis de CPO-D e agrupados em dois grupos distintos, de 25 elementos cada. O grupo A formado pelo conjunto de indivíduos com alto índice de cárie, CPO-D superior a 3, e o grupo B constituído pelo conjunto de indivíduos com baixo índice de cárie, CPO-D inferior 3. Foram excluídos, neste estudo, indivíduos portadores de qualquer doença sistémica e que estivessem sob o efeito de antibióticos.

Foram estudados mais indivíduos, mas apenas estes estavam de acordo com os critérios de inclusão

Os 50 indivíduos estudados representam 1% dos utentes da clínica no período do estudo.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

Todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Informado.

Variáveis de estudo

Protocolo clínico

Os indivíduos estudados foram avaliados quanto aos seus índices de cárie por meio de um exame clínico.

O diagnóstico das lesões de cárie teve em conta os critérios da OMS, tendo sido apenas realizado um exame clínico (visual e tátil), não se efetuando quaisquer exames radiológicos²⁹.

Protocolo laboratorial

Após o exame clínico foi feita a recolha, com uma zaragatoa estéril, de uma amostra do dorso da língua, ao nível do sulco mediano da parte anterior da língua. A amostra foi guardada num tubo de ensaio com meio de transporte BHI (Brain Heart Infusion) e transportada para o laboratório.

As amostras foram inoculadas em meios de cultura: Columbia Agar (bioMérieux), MSA (Mitis-Salivarius-Agar), MSB (Mitis-Salivarius-Bacitracina) e Rogosa Agar^{29,30}. Os 3 primeiros foram incubados em aerobiose e em atmosfera de anaerobiose, a 37 °C durante 48 h, e o Rogosa agar foi incubado em microaerofilia, a 37 °C durante 48 h.

Identificação das amostras. Após a incubação os microrganismos isolados foram diferenciados visualmente, pelo seu aspeto e pela sua atividade hemolítica. O número de UFC foi registado numa ficha de participante. Posteriormente, foram re-isoladas colónias em meio Columbia Agar, para efetuar a sua identificação. Estas foram incubadas nas mesmas condições de temperatura e atmosfera do seu isolamento.

Foi efetuada coloração de Gram e pesquisada a presença da enzima catalase em todos os microrganismos. Quando esta última se encontrava presente, o microrganismo foi re-isolado em meio Chapman Agar (bioMérieux) e foi efetuado o teste de coagulase, com o fim de despistar uma possível estirpe de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo.

Posteriormente, procedeu-se à identificação dos microrganismos por meio de galerias de identificação API® (bioMérieux). Para as estripes de Streptococos utilizou-se o teste API 20 Strep®, para as bactérias anaeróbias utilizou-se o teste API 20 A®, e para os bacilos Gram negativos utilizou-se o teste API 20 E®. Para a identificação dos Lactobacilos utilizou-se o teste API 50 CH®.

Análise estatística

Os dados obtidos nesta investigação foram submetidos à análise estatística pelo programa PASW v18, utilizando métodos de estatística descritiva e inferencial (testes do Qui-Quadrado, t-Student e de Mann-Whitney). Os testes foram aplicados considerando um nível de significância de 5%.

Tabela 1 – Valores médios de CPO-D e de idades.

	Valor médio	Desvio padrão	Grupo
CPO-D	13,44	7,14	A
Idades	0,96	1,14	B
	34,56	14,84	A
	21,68	3,35	B

Resultados

No presente estudo foi avaliada uma amostra de 50 indivíduos, separados em dois grupos: grupo A com alto índice de CPO-D e grupo B com baixo índice de CPO-D.

A média dos valores de CPO-D do grupo A foi maior ($13,44 \pm 7,14$) que a do grupo B ($0,96 \pm 1,14$) (tabela 1).

Comparativamente à média das idades dos indivíduos em estudo, o grupo A apresentou um valor médio ($34,56 \pm 14,84$) mais alto do que o grupo B ($21,68 \pm 3,35$) (tabela 1).

A nível microbiológico foram identificadas 19 espécies distintas num total de $2,55 \times 10^7$ UFC/ml isoladas. A espécie bacteriana mais encontrada nas amostras foi o *Streptococcus salivarius*, (32% das espécies encontradas) seguido do *Streptococcus viridans* (24%) e do *Streptococcus mitis* (14%). O *Streptococcus milleri* (13%) o *Lactobacillus spp* (5%) e a *Prevotella melaninogenica/oralis* (3%), seguem-se às bactérias anteriores. Com uma percentagem idêntica de 1%, encontram-se as espécies *Staphylococcus aureus* e a *Gemella morbillorum*. As restantes espécies encontravam-se em percentagens inferiores a 1%. A espécie menos encontrada foi o *Streptococcus anginosus* (fig. 1).

Adicionalmente, foi também efetuada uma análise estatística a nível do cruzamento das variáveis do exame clínico (índice CPO-D), com os microrganismos isolados.

Na comparação das variáveis foram utilizados os testes estatísticos do Qui-Quadrado, t-Student e Mann-Whitney para um nível de significância de 5%.

Os resultados referentes aos indivíduos portadores de *Streptococcus mutans* e também de *Lactobacillus spp*, mostram um número superior de indivíduos portadores com CPO-D elevado em comparação aos indivíduos portadores com CPO-D baixo ($p < 0,001$) (tabela 2). Nestes dados constatamos que 76% dos indivíduos com CPO-D elevado são portadores de *Streptococcus mutans* divergindo dos valores encontrados para os indivíduos com CPO-D baixo, que se situou nos 12% de indivíduos portadores. A nível dos *Lactobacillus spp* constata-se que 96% dos indivíduos com CPO-D alto analisados são portadores, sendo que os valores encontrados para os indivíduos com CPO-D baixo, foi de 48% de indivíduos portadores (tabela 2).

Verificou-se ainda que os *Lactobacillus spp* se encontram em maior quantidade nos indivíduos com CPO-D elevado ($4,70 \pm 0,30$), comparando com os de CPO-D baixo ($2,98 \pm 0,47$) ($p < 0,001$) (tabela 3).

Discussão

Os resultados obtidos indicam uma maior prevalência de bactérias no dorso lingual em indivíduos com CPO-D alto. Neste estudo verificou-se que o dorso lingual funciona como

Tabela 2 – N° indivíduos portadores / classe de CPO-D.

	CPO-D elevado (n=25)	CPO-D baixo (n=25)	p
<i>Streptococcus sallivarius</i>	25 (100%)	25 (100%)	-
<i>Streptococcus mitis</i>	23 (92%)	25 (100%)	-
<i>Streptococcus milleri</i>	25 (100%)	19 (76%)	-
<i>Streptococcus viridans</i>	23 (92%)	25 (100%)	-
<i>Streptococcus mutans</i>	19 (76%)	3 (12%)	< 0,001 ^a
<i>Lactobacillus spp</i>	24 (96%)	12 (48%)	< 0,001 ^a

^a Teste do Qui-Quadrado.

importante nicho para várias estirpes bacterianas incluindo estirpes cariogénicas, como é o caso dos *Streptococcus mutans* e dos *Lactobacillus spp.*. Este pode ser considerado um estudo piloto, cujos resultados preliminares demonstram a importância de no futuro aprofundar este tema e verificar se

este nicho bacteriano terá influência no desenvolvimento da cárie.

Os resultados mostram que o número de microrganismos isolados nos indivíduos com CPO-D elevado é, na sua maioria, superior aos dos indivíduos com CPO-D baixo. Estes dados vão

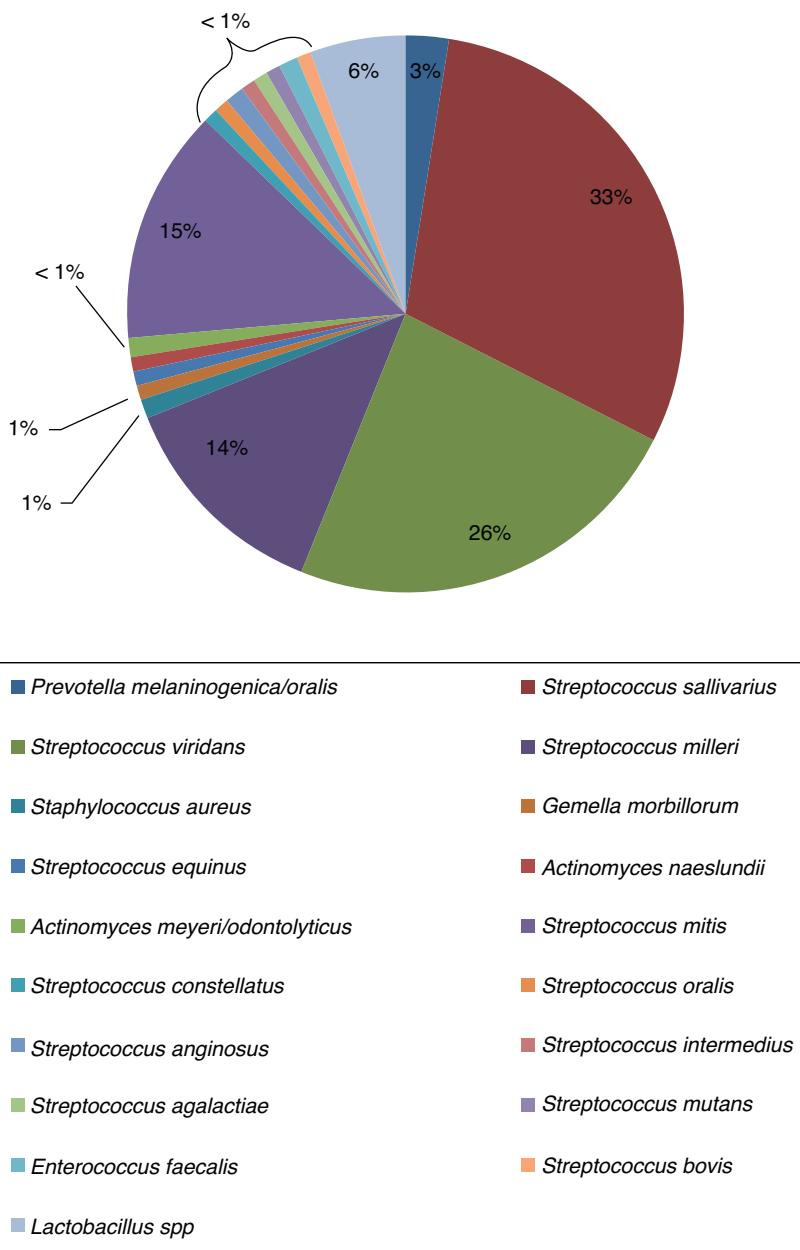


Figura 1 – Espécies bacterianas isoladas.

Tabela 3 - Log (UFC/ml) / classe de CPO-D.

	CPO-D elevado Média ± desvio padrão	CPO-D baixo Média ± desvio padrão	p
<i>Streptococcus salivarius</i>	4,77 ± 0,52	4,57 ± 0,58	0,211 ^a
<i>Streptococcus mitis</i>	4,43 ± 0,50	4,24 ± 0,43	0,174 ^a
<i>Streptococcus milleri</i>	4,49 ± 0,55	4,21 ± 0,38	0,053 ^a
<i>Streptococcus viridans</i>	4,58 ± 0,63	4,45 ± 0,52	0,434 ^a
<i>Streptococcus mutans</i>	2,76 ± 0,61	2,55 ± 0,13	0,885 ^b
<i>Lactobacillus spp</i>	4,70 ± 0,30	2,98 ± 0,47	< 0,001 ^b

^a Teste t-Student.^b Teste Mann-Whitney.

ao encontro dos resultados encontrados em outros estudos que demonstram a presença de um aumento de microrganismos, especialmente nos valores dos *Streptococcus mutans* e nos *Lactobacillus spp* em indivíduos com CPO-D elevados^{15,19,25,32}. Por outro lado, existem estudos que mostram que a escovagem da língua contribuiu para a diminuição dos níveis de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus spp*.^{2,19}

A existência de significado estatístico nas diferenças encontradas nos indivíduos portadores de *Streptococcus mutans* e de *Lactobacillus spp* com diferentes CPO-D corroboram com a literatura corrente, que identifica esses dois microrganismos como principais agentes cariogénicos. Em relação aos outros microrganismos, a ausência de significado estatístico nas diferenças encontradas nas suas quantidades, parecem indicar a pouca relação existente entre os seus níveis e o índice de CPO-D. Na verdade, ainda não se encontra bem definido a sua contribuição para o desenvolvimento da cárie dentária. Alguns estudos^{16,31} evidenciam o potencial cariogénico destes microrganismos, demonstrando a sua capacidade acídogenética, como é o caso do *Streptococcus mitis* e do *Streptococcus milleri*, mas pelo contrário, outros estudos^{28,32} caracterizam esses microrganismos como benéficos, na medida que ocupam os nichos dos microrganismos cariogénicos, impedindo assim a sua colonização.

A pequena representatividade da amostra e o facto de ser um estudo retrospectivo permitem apenas mostrar que o dorso da língua é um importante nicho de microrganismos. Para aferir da importância deste nicho para o desenvolvimento da cárie, são necessários estudos mais aprofundados. Muito pouco se sabe sobre a flora microbiana do dorso lingual, por isso consideramos que este estudo piloto é importante como base para no futuro se delinearem estudos mais completos.

Conclusão

Estes dados apontam para o interesse do estudo do dorso lingual na saúde oral e como tal, deve realçar-se a importância da escovagem da língua, juntamente com a escovagem dos dentes e o uso do fio dentário como forma eficaz no combate da placa bacteriana e na prevenção da cárie dentária.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

BIBLIOGRAFIA

1. Ureña JL. Composición y ecología de la microbiota oral. Em: Microbiología Oral. 2^a ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana de España; 2002. p. 103-571.
2. Bordas A, McNab R, Staples AM, Bowman J, Kanap J, Bosma MP. Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. Arch Oral Biol. 2008;53:13-8.
3. Christensen GJ. Why clean your tongue? J Am Dent Assoc. 1998;129:1605-7.
4. Danser MM, Gomez MS, Van der Weijden GA. Tongue coating and tongue brushing: a literature review. Inter J Dent Hygiene. 2003;1:151-8.
5. Faveri M, Feres M, Shibli A, Hayacibara R, Hayacibara M, Figueiredo C. Microbiota of the Dorsum of the Tongue After Plaque Accumulation: An Experimental Study in Humans. J Periodont. 2006;77:1539-46.
6. Tanner AC, Milgrom PM, Kent Jr R, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA, et al. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. J Dent Res. 2002;81:53-7.
7. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, et al. Diversity of Bacterial Populations on the Tongue Dorsa of Patients with Halitosis and Healthy Patients. J Clin Microbiol. 2003;41:558-63.
8. Teles C, Smith A, Ramage G, Lang S. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. Eur J Clin Microb Infect Dis. 2010;1:8, doi:10.1007/s10096-010-1076-y.
9. Salonen L, Allander L, Bratthall D, Hellden L. Mutans Streptococci, Oral Hygiene, and Caries in an Adult Swedish Population. J Dent Res. 1990;69:1469-75.
10. Thibodeau EA, O'Sullivan DM, Tinanoff N. Mutans streptococci and caries prevalence in preschool children. C Dent Oral Epidemiol. 1993;21:288-91.
11. Kuramitsu BY, Wang HK. Virulence properties of cariogenic bacteria. BMC Oral Health. 2006;6:1-4.
12. Nishikawara F, Nomura Y, Imai S, Senda A, Hanada N. Evaluation of Cariogenic Bacteria. Eur J Dent. 2007;1:31-9.
13. Thibodeau EA, O'Sullivan DM. Salivary mutans streptococci and dental caries patterns in pre-school children. C Dent Oral Epidemiol. 1996;24:164-8.
14. Roeters FJ, van der Hoeven JS, Burgersdijk RC, Schaeken MJ. Lactobacilli, mutants streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. Caries Res. 1995;29:272-9.
15. Llena-Puy MC, Montañana-Llorens C, Forner-Navarro L. Cariogenic oral flora and its relation to dental caries. ASDC J Dent Child. 2000;67:42-6.
16. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries

- causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13:108-25.
17. Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. *C Dent Health*. 2004;21:96-101.
18. Lindquist B, Emilson CG. Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in the Human Dentition. *J Dent Res*. 1990;69:1160-6.
19. Almas K, Al-Sanawi E, Al-Shahrani B. The effect of tongue scraper on mutans streptococci and lactobacilli in patients with caries and periodontal disease. *Odonto-stomatologie Tropicale*. 2005;109:5-10.
20. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The Microbiology of Primary Dental Caries in Humans. *J Dent Edu*. 2001;65:1028-37.
21. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RC, Rodrigues LK, Nobre-dos-Santos M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood carie. *Arch Oral Biol*. 2010;55:365-73.
22. Yang R, Argimon S, Li Y, Zhou X, Caufield PW. Determining the genetic diversity of lactobacilli from the oral cavity. *J Microbiol Methods*. 2010;82:163-9.
23. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3128-36.
24. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004;42:3023-9.
25. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994;73:672-81.
26. Fejerskov O, Kidd E, Nyvad B, Baelum V. Defining the disease: an introduction. Em: Fejerskov O, Kidd E, editores *Dental Caries – The Disease and its clinical Management*. 2^a ed. Blackwell Publishing; 2008. p. 3-246.
27. Fontana M, Young DA, Wolff MS. Evidence-Based Caries, Risk Assessment, and Treatment. *Dent Clin North Am*. 2009;53:149-61.
28. Bowden GH, Edwardsson S. Oral ecology and dental caries. Em: Thylstrup A, Fejerskov O, editores *Text Book of Clinical Cariology*. 2^a ed. Munksgaard; 1996. p. 13-62.
29. Sánchez-Pérez L, Acosta-Gó AE. Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture. *Arch Oral Biol*. 2001;46:49-55.
30. Gutiérrez de Annan S, Ruiz de Valladares RE, Benito de Cárdenas IL. Mitis Salivarius-bacitracin 10% sacarose agar for oral streptococci and *Streptococcus mutans* counts. *Acta Odontol Latinoam*. 1997;10:47-53.
31. van Houte J. Microbiological predictors of caries risk". *Adv Dent Res*. 1993;7:87-96.
32. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5753-9.