

ARTÍCULO ORIGINAL

Correspondencia entre el índice de placa y el recuento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus sp.* en una población infantil: Un estudio transversal.

Correspondence between plaque index and *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* counts in a child population: A cross-sectional study

María Cristina Arango ¹  | Pamela González ¹  | Alejandra Perea ¹  | Lina María Villegas ¹  | Carlos Humberto Martínez Cajas ¹  | Judy Villavicencio ¹ .

 ACCESO ABIERTO

¹ Universidad del Valle, Facultad de Salud, Escuela de Odontología, Departamento de Odontopediatría y Ortopedia Maxilar, Cali, Colombia.

Citación

Arango MC, González P, Perea A, Villegas LM, Martínez-Cajas CH, Villavicencio J. Correspondencia entre el índice de placa y el recuento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus sp.* en una población infantil: Un estudio transversal. *Rev Estomatol.* 2020;28(2):1-7. DOI:10.25100/re.v28i2.8148

Correspondencia

María Cristina Arango. Dirección: Calle 4B # 38 – 00, Edificio 134, Cali, Colombia. Correo:maria.cristina.arango@correounivalle.edu.co

Copyright:

© Universidad del Valle.



RESUMEN

Antecedentes: La identificación de microorganismos como *Streptococcus mutans* (SM) y *Lactobacillus sp.* (LB) es un predictor del desarrollo de caries, sin embargo los métodos de identificación son de acceso limitado por su alto costo.

Objetivo: determinar la correlación entre la biopelícula dental medida por el índice de placa bacteriana de (IPB) Silness y Løe modificado y el recuento de SM y LB en niños colombianos en edad preescolar. Este es un estudio descriptivo de corte transversal y correlacional.

Materiales y métodos: Se tomaron 202 muestras de niños entre los 3 y 4 años de edad de tres jardines Infantiles de Cali, Colombia, pertenecientes al estrato socioeconómico 1 y 2, evaluados en cuatro tiempos (0, 3, 6 y 9 meses).

Resultados: Hubo una correlación entre el IPB más alto y el mayor recuento de unidades formadoras de colonia de SM sólo a los 3 meses ($p = 0,003^*$). Los recuentos de LB fueron homogéneos en todos los niños y no presentaron correlación con el IPB.

Conclusión: Se observaron resultados mixtos sobre la relación entre IPB y los recuentos de SM presentes en la saliva, por lo cual se requiere un análisis de múltiples factores.

PALABRAS CLAVE

Biopelícula dental; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus sp.*; caries dental.

ABSTRACT

Background: The identification of microorganisms such as *Streptococcus mutans* (SM) and *Lactobacillus spp.* (LB) is a predictor of the development of caries, however the identification methods are of limited access due to their high cost.

Aim: To determine the correlation between the dental biofilm measured by the modified Silness and Løe dental plaque index (DPI) and the SM and LB count, in preschool children from Colombia.

Materials and methods: This is a descriptive cross-sectional and correlational study. We took 202 samples from children between 3 and 4 years of age from three kindergartens in Cali, Colombia, belonging to socioeconomic stratum 1 and 2, evaluated at four times (0, 3, 6 and 9 months).

Results: We found a correlation between the highest IPB and the highest count of SM colony forming units only at 3 months ($p = 0.003^*$). LB counts were homogeneous in all children and there was no correlation with IPB.

Conclusion: We observed mixed results on the relationship between IPB and the counts of SM present in the saliva, therefore an analysis of multiple factors is required.

KEY WORDS

Dental plaque; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus spp.*; dental caries.

Relevancia Clínica

En el presente estudio se observaron hallazgos sobre la relación entre el Índice de Placa Bacteriana de Silness y Løe modificado, y los recuentos de *Streptococcus mutans* presentes en la saliva, donde la cantidad de placa bacteriana encontrada en un paciente se correlaciona de manera directa con la presencia de SM y puede afectar la existencia o no de caries.

Introduction

La caries dental se define como una enfermedad dinámica multifactorial, no transmisible, la cual es mediada por una biopelícula, modulada por la dieta que resulta en la pérdida neta de minerales de tejidos duros dentales.¹⁻⁵ Así mismo, está determinado por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Y Como consecuencia de este proceso, se desarrolla una lesión de caries.⁶

En Colombia, el cuarto Estudio Nacional De Salud Bucal en 2014 evaluó 2'573.286 niños, evidenciando que la caries afecta niños desde tempranas edades, ya que se reportó que el 60.2% de los niños de un año mostraban caries y entre los 3 y 5 años se incrementaba su porcentaje de 47.1% al 62.1% cuando se analiza la prevalencia modificada (ICDAS).^{1,4}

En la biopelícula dental existen microorganismos con potencial cariogénico como el *Streptococcus mutans* (SM) y especies de *Lactobacillus* sp. (LB), que inducen desmineralización directa sobre el tejido inorgánico y de manera indirecta generan la destrucción orgánica del diente, la cavitación del esmalte y la formación de la lesión de caries.⁷⁻⁹

La evidencia científica es clara en cuanto a la presencia de caries dental y los múltiples factores de riesgo, siendo indispensable la placa bacteriana para su aparición y desarrollo. Existen diferentes índices para valorar el riesgo de presentar caries dental, que miden la calidad o la cantidad de esta biopelícula dental,¹⁰⁻¹⁴ y entre los más utilizados está el índice Silness y Løe.^{13,14}

Se ha identificado microorganismos como SM relacionados con etiología de la caries dental, sin embargo, los métodos de identificación de los microorganismos cariogénicos son de acceso limitado por su alto costo.⁷ Al existir una relación entre la cantidad y calidad de la biopelícula dental con la presencia de bacterias cariogénicas, se podría sugerir la posible implementación de un índice de placa bacteriana como predictor de caries dental, teniendo la presencia de SM y LB, como también la probabilidad que el paciente presente caries.

En este contexto, este estudio busca determinar la correlación entre la biopelícula dental medida por el índice de placa bacteriana (IPB) Silness y Løe modificado y el recuento de SM y LB, a partir de datos recolectados en 202 preescolares en Cali, Colombia.

Materiales y métodos

Diseño del estudio y cálculo de la muestra

Se realizó un estudio descriptivo, utilizando los datos clínicos y microbiológicos de la base de datos de 202 preescolares (3 y 4 años) del grupo control del estudio registrado en Clinical Trials con el código ACTRN12616001363471,¹⁵ los cuales tenían registros completos en cuatro tiempos de su estudio (0, 3, 6 y 9 meses de estudio).

La muestra fue escogida por conveniencia y la unidad de análisis consistió en 202 preescolares previamente evaluados para índice de placa bacteriana, recuento de SM y caries dental y consignadas en la historia clínica según el tipo de evaluación así:

Los datos consignados del IPB de Silness y Løe modificado¹⁶, incluyendo como valores 0-la superficie libre de placa, 1-placa visible solo al paso del instrumento y 2-placa visible a simple vista fueron tomados por un odontólogo previamente estandarizado en este índice (kappa 0.80).

Análisis microbiológico

Los datos consignados del análisis microbiológico de la muestra de saliva incluyen:

Las muestras de saliva no estimulada entre 1-2 ml fueron colectadas por un odontopediatra, una hora después del desayuno durante las primeras horas de la mañana (9:00 – 10:00), sin cepillado previo.

Para el análisis microbiológico se usaron los medios de cultivo como método cuantitativo para el aislamiento y la estimación de los niveles de unidades formadoras de colonia (UFC), en el caso de SM se usó el medio selectivo Agar Mitis salivarius con telurito y bacitracina (MSTB) y el Agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) para LB. Las colonias se identificaron por sus características morfológicas.^{17, 18}

Los recuentos de UFC por mililitro (UFC/ml) se observaron y contaron bajo un estereomicroscopio. El número de UFC se multiplicó por el número de veces que se diluyó originalmente la muestra 10-3. Los valores fueron asignados a categorías de riesgo de presentar caries dental sobre la base de la densidad del crecimiento de UFC de SM (Tabla 1). Para los conteos de LB, se registró presencia/ausencia con valores < 0 y ≥1.¹⁹

Tabla 1. Riesgo de presentar caries dental sobre la base de la densidad del crecimiento de UFC de SM. Fuente: Modificado de ²⁰⁻²².

Riesgo	UFC/ml SM
Muy bajo	<10.000
Bajo	10.000-100.000
Medio	100.000-500.000
Alto	>500.000

Los preescolares habían sido previamente evaluados para caries dental, y consignadas en la historia clínica según el sistema de clasificación ICDAS-EPI. Los datos fueron consignados por un odontólogo estandarizado en este índice con un Kappa de (Kappa intraexaminador 0,85 e interexaminador 0,72), usando los protocolos para su realización tal como la superficie limpia, control de humedad, examen visual y táctil con explorador de punta redondeada. (ICDAS 2 a 6).^{23, 24}

Análisis estadístico

Los datos se registraron en Microsoft Excel y se validaron a través del software Epidat 3.1. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Stata 13.0®. Los análisis descriptivos univariados se realizaron con medias, desviación estándar, mediana y rango intercuartílico según la normalidad. Se tabularon las variables para obtener los grupos de niños sanos y caries con su respectiva descripción, siendo la variable dependiente la presencia/ausencia de caries, aplicando la prueba chi-cuadrado X^2 de Pearson.

Para contrastar las variables de interés en los cuatro momentos de evaluación se usó la prueba de Friedman. Para determinar la relación entre las UFC de SM y LB, riesgo de caries según la cantidad de SM versus nivel de presencia de placa bacteriana se empleó el coeficiente de correlación tau-b de Kendall. Se estableció un nivel de confianza del 95% y significancia del 5%. La correlación entre variables numéricas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Declaración sobre aspectos éticos

Para este estudio se utilizaron los datos clínicos y microbiológicos del estudio registrado en Clinical Trials con el código ACTRN12616001363471 ¹⁵. Este estudio siguió las normas éticas del comité institucional encargado de supervisar los ensayos en personas y la declaración de Helsinki de 1975 modificada en 2004, así como los principios y normas

éticas de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. El Comité de Revisión Institucional de Ética Humana aprobó el protocolo de este proyecto a través de la Acta número 009-015.

Resultados

De los 227 registros de pacientes en el grupo control de línea de base del estudio ACTRN12616001363471 se presentó una pérdida de seguimiento a los 9 meses del 11.0%, quedando como muestra 202 participantes, los cuales fueron analizados en el presente estudio. La pérdida de seguimiento se atribuye a retiro de los niños de la institución. En la tabla 2 se presentan las características clínicas (ICDAS) y sociodemográficas de los participantes.

Tabla 2. características clínicas (ICDAS) y sociodemográficas de los participantes.

Características	n=202
Mujeres	47,6
Hombres	52,4
Edad (años), media \pm DS	3.53 \pm 0.42
ICDAS 2-6 >0, %	47.6
ICDAS 2 >0, %	40.5
ICDAS 3-4 >0, %	18.5
ICDAS 5-6 >0, %	21.6

Se presentó una disminución en la presencia de SM ($p=0,000$) en los 4 tiempos evaluados. A los 0 meses 31.2%, a los 3 meses 33.7%, a los 6 meses 19% y a los 9 meses 18.8%. En cuanto a LB no hubo diferencias significativas en los 4 tiempos evaluados ($p=0.716$).

En el análisis del cambio de riesgo cariogénico medido según cantidad de UFC de SM y el IPB en los cuatro tiempos, se identificó que 7/10 pacientes tenían riesgo bajo, y el riesgo alto fue el de menor proporción 4.4%; también se logró establecer que tienen una baja correlación positiva, aunque sin significancia estadística ($p=0.838$) (Tabla 3).

Correlación entre el nivel de presencia de placa y nivel riesgo de caries dental según la cantidad de SM

En la tabla 4 se muestra la correlación que se presenta en los cuatro tiempos analizados, del nivel de presencia de placa bacteriana y el nivel de riesgo de caries según cantidad de SM. Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa ($p=0.002$) solo a los 3 meses.

Tabla 3. Cambio en el Riesgo Cariogénico según cantidad de SM en los cuatro tiempos. Fuente: Elaboración propia.

	0 mes n (%)	3 meses n (%)	6 meses n (%)	9 meses n (%)	P
Riesgo cariogénico					
Bajo	143 (70,79)	142 (69,80)	164 (81,59)	164 (81,19)	0,000
Medio	30 (14,85)	32 (15,84)	16 (7,96)	23 (11,39)	
Alto	20 (9,90)	18 (8,91)	13 (6,47)	10 (4,95)	
Muy alto	9 (4,46)	11 (5,45)	8 (3,98)	5 (2,48)	
Mediana IPB					
IPB 0	141 (69,80)	133 (65,84)	137 (67,82)	143 (70,79)	0,264
IPB 1	47 (23,27)	53 (26,24)	49 (24,26)	43 (21,29)	
IPB 2	14 (6,93)	16 (7,92)	16 (7,92)	16 (7,92)	

IPB 0=Superficie libre de placa. IPB 1=Placa visible al pasar el instrumento. IPB 2=Placa visible a simple vista

Tabla 4. Correlación entre el nivel de presencia de placa y nivel riesgo de caries dental según la cantidad de SM. Fuente: Elaboración propia.

Nivel IPB	Riesgo cariogénico SM				tau -b	p
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	4 n (%)		
Mes 0						
IPB 0	113 (70,19)	22 (66,67)	15 (65,22)	3 (30,00)	0,1 07	0,1 03
IPB 1	38 (23,60)	10 (30,30)	6 (26,09)	4 (40,00)		
IPB 2	10 (6,21)	1 (3,03)	2 (8,70)	3 (30,00)		
Mes 3						
IPB 0	109 (70,32)	16 (62,50)	14 (66,67)	3 (25,00)	0,2 05	0,0 02
IPB 1	37 (23,87)	14 (37,50)	5 (23,81)	6 (50,00)		
IPB 2	9 (5,81)	3 (0,00)	2 (9,52)	3 (25,00)		
Mes 6						
IPB 0	114 (0,00)	10 (62,50)	6 (46,15)	7 (87,50)	0,0 45	0,5 03
IPB 1	38 (0,00)	6 (37,50)	4 (30,77)	1 (12,50)		
IPB 2	13 (0,00)	0 (0,00)	3 (23,08)	0 (0,00)		
Mes 9						
IPB 0	119 (72,56)	12 (52,17)	8 (80,00)	4 (80,00)	0,0 57	0,3 90
IPB 1	32 (19,51)	9 (39,13)	1 (10,00)	1 (20,00)		
IPB 2	13 (7,93)	2 (8,70)	1 (10,00)	0 (0,00)		

IPB 0=Superficie libre de placa. IPB 1=Placa visible al pasar el instrumento. IPB 2=Placa visible a simple vista

Correlación entre el nivel de presencia de placa y nivel riesgo de caries dental según la cantidad de SM

En la Tabla 4 se muestra la correlación que se presenta en los cuatro tiempos analizados, del nivel de presencia de placa bacteriana y el nivel de riesgo de caries según cantidad de SM.

Se encontró una correlación positiva estadísticamente significativa ($p=0.002$) solo a los 3 meses. Al analizar la relación entre el nivel de placa bacteriana y el recuento de UFC de SM también se presentó una correlación positiva (Tau-b 0,185) $p=0,003$. La proporción de caries dental a los 0 meses fue de ceo 18.8% (38/202) y ceo modificado de 45.04% (91/202), estos valores fueron constantes en los cuatro tiempos, sin variaciones significativas en el tiempo.

Se realizó un análisis adicional de los pacientes que presentaban caries dental, para determinar la presencia o no de SM (tabla 5), los niveles de IPB (tabla 5) y su relación con caries dental. Se encontró correlación positiva a los 3 meses, reportándose que aquellos pacientes que tenían caries dental, de igual manera presentaban un 57.4% de presencia de SM, siendo estadísticamente significativo (tabla 5).

Tabla 5. Presencia de SM en niños con caries dental. Fuente: Elaboración propia.

	SM		p
	No n (%)	Si n (%)	
Inicio	57 (41,0)	34 (54,0)	0,086
3 meses	53 (39,6)	39 (57,4)	0,016
6 meses	66 (40,7)	23 (57,5)	0,056
9 meses	68 (41,5)	20 (52,6)	0,211

Así mismo se encontró una correlación positiva del IPB con el desarrollo de caries, siendo estadísticamente significativa en los cuatro tiempos (Tabla 6).

Tabla 6. Nivel de placa bacteriana en niños con caries dental. Fuente: Elaboración propia.

Nivel IPB	IPB 0 n (%)	IPB 1 n (%)	IPB 2 n (%)	p
Inicio	51 (36.2)	32 (68.1)	8 (57.1)	0.000
3 meses	51 (38.3)	32 (60.4)	9 (56.3)	0.016
6 meses	49 (35.8)	30 (61.2)	10 (62.5)	0.003
9 meses	51 (35.7)	27 (62.8)	10 (62.5)	0.002

IPB 0=Superficie libre de placa. IPB 1=Placa visible al pasar el instrumento. IPB 2=Placa visible a simple vista

Discusión

En este estudio se incluyeron niños con dentición primaria completamente establecida, evidenciando colonización bacteriana, especialmente de SM. En este sentido, es ideal que la evaluación del riesgo de caries, así como la promoción y prevención, se inicie con este grupo de edad. La saliva es uno de los factores implícitos en la formación de la caries y su aplicabilidad en el diagnóstico de esta es de vital importancia, para así determinar la posibilidad de la presencia de microorganismos²⁵. Las especies microbianas salivales reflejan la composición de la comunidad microbiana oral y podrían servir como biomarcadores del estado de salud y enfermedad de la cavidad oral. Es por esto que en este estudio las muestras tomadas fueron de saliva.

Una de las formas para evaluar la presencia de placa bacteriana es por medio de índices²⁶⁻²⁸. El índice de Silness y Løe modificado (códigos de “0, 1 y 2”)²⁸, mide la calidad y cantidad de placa bacteriana en la superficie dentaria basado en la guía del ICCMS²⁹. Con éste se logró establecer una correspondencia positiva entre el grado de IPB y la cantidad de bacterias presentes de SM a los 3 meses, pero no fue concluyente en los otros tiempos de seguimiento del estudio³⁰⁻³³.

Los resultados aquí encontrados coinciden con estudios previos realizados en diferentes países, donde los autores informaron acerca de la correlación positiva, aunque baja, entre la concentración de SM en la saliva y la caries dental^{34,35}. Dichos resultados sugieren que la cantidad de placa bacteriana encontrada en un paciente se correlaciona de manera directa con la presencia de SM y puede afectar la existencia o no de caries. Resultados similares fueron hallados por el estudio de Nanda et al.³⁵, en donde se encontró que se puede evidenciar una correlación de forma directa y fuerte entre los recuentos de SM en la placa y la actividad de caries en niños de 3 a 8 años³⁵.

La correlación positiva del IPB con el desarrollo de caries, encontrada en todos los periodos de tiempo analizados coinciden con autores que describen la interacción existente entre microorganismos, dieta y tejido dental, como la causa principal del desarrollo de la caries dental.³⁶ Tanzer et al.,³⁷ encontraron que los LB también son marcadores de riesgo para caries de infancia temprana y que estos también están presentes en caries rampante y establecida.^{38,39} En el presente estudio, de hecho, hubo presencia de SM en la línea de base donde se dio un aumento del porcentaje al mes 3, contrario al LB que se presentó en grandes cantidades en todos los pacientes.

A pesar de que no hay un patrón característico que en este estudio diga que el IPB manejado de la forma modificada es un buen indicador por sí solo, con los resultados del actual estudio es posible establecer un indicador de riesgo potencial

para el desarrollo de caries dental y de esta manera incrementar las medidas de prevención en poblaciones que, por diferentes características presentan un alto potencial de susceptibilidad.^{12,40}

En el estudio realizado en población de adultos mayores por Abe et al.,⁴¹ los autores encontraron que los pacientes con una higiene bucal deficiente según lo indicado por sus puntuaciones de IPB demostraron recuentos de bacterias salivales significativamente más altos que aquellos con una buena puntuación para la higiene bucal. A pesar de que este estudio fue realizado en adultos y las bacterias que evaluaron fueron diferentes a las que aquí se analizaron, los resultados fueron similares a los obtenidos con SM.

Conclusión

En el presente estudio se observaron hallazgos variables sobre la relación entre el IPB de Silness y Løe modificado, y los recuentos de SM presentes en la saliva, en donde la cantidad de placa bacteriana encontrada en un paciente se correlaciona de manera directa con la presencia de SM y puede afectar la existencia o no de caries. En este sentido, se sugiere que éste índice puede dar una aproximación a la evaluación de SM y LB, pero debido a la complejidad del riesgo de caries bacteriano y de predicción en los niños, se recomienda en un próximo estudio realizar un análisis de múltiples factores. Dentro de las limitaciones que se tienen en el presente estudio, con relación al diseño y tipo de muestra es que los datos obtenidos son representativos exclusivamente a la población evaluada.

Declaración de conflict de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses que declarar con respecto a la publicación de este artículo. Los autores son independientes con respecto a las instituciones financiadoras y de apoyo, y durante la ejecución del trabajo o la redacción del manuscrito no han incidido intereses o valores distintos a los que tiene la investigación.

Fuentes de financiación

Este proyecto fue apoyado económicamente por Colciencias (Gobierno de Colombia) y la (Cegado). Contrato: (Cegado).

Referencias

1. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(1):5-12. doi: 10.1111/j.1600-0528.1997.tb00894.x.
2. Dye BA, Hsu K-LC, Afful J. Prevalence and Measurement of Dental Caries in Young Children. *Pediatr Dent.* 2015;37(3):200-16.
3. Aliakbari E, Gray-Burrows KA, Vinall-Collier KA, Edwebi S, Marshman Z, McEachan RRC, et al. Home-based toothbrushing interventions for parents of young children to reduce dental caries: A systematic review. *Int J Paediatr Dent.* 2020. doi: 10.1111/ipd.12658.
4. Ministerio de Salud y Protección Social. IV Estudio Nacional De Salud Bucal - ENSAB IV. Situación en Salud Bucal. Bogotá; 2014. Disponible: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/P/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>.
5. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:17030. doi: 10.1038/nrdp.2017.30.
6. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14. doi: 10.1159/000503309.
7. Banas JA, Drake DR. Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? *BMC Oral Health [Internet].* 2018;18(1):129. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0595-2>
8. Medina A, Moreno LC, Velasco MC, Gutiérrez Cepeda SJ. Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 "in vitro". *Nova.* 2005;3(3):25-30. Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/download/30/59?inline=1>.
9. Jiang S, Gao X, Jin L, Lo ECM. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12). doi: 10.3390/ijms17121978
10. Corchuelo J. Sensibilidad y especificidad de un índice de higiene oral de uso comunitario. *Colomb Méd.* 2011;42:448-57. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/283/28321543005.pdf>
11. Figueiredo MGOP, Takita SY, Dourado BMR, Mendes H de S, Terakado EO, Nunes HR de C, et al. Periodontal disease: Repercussions in pregnant woman and newborn health-A cohort study. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225036. doi: 10.1371/journal.pone.0225036.
12. Al-Ghutaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common Periodontal Diseases of Children and Adolescents. Baskaradoss JK, editor. *Int J Dent.* 2014;2014:850674. doi: 10.1155/2014/850674.
13. Cepeda de Romero B, Corrales L, Giraldo-Parra J, Ardila G. Implementación y evaluación de un protocolo preventivo para controlar placa bacteriana en pacientes de ortodoncia. *Univ Odontológica.* 2013;32(68):63-67. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231240433007>.
14. Aguilar-Agullo M, Cañamas-Sanchis M, Ibáñez-Cabanell P, Gil-Loscos F. Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia.* 2003;13(3):233-44.
15. Villavicencio J, Villegas LM, Arango MC, Arias S, Triana F. Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. *J Appl Oral Ciencia.* 2018;26:e20170318. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0318.
16. Sekino S, Takahashi R, Numabe Y, Okamoto H. Current status of periodontal disease in adults in Takahagi, Japan: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2020;20(1):60. doi: 10.1186/s12903-020-1046-4.

17. Lobo CIV, Rinaldi TB, Christiano CMS, De Sales Leite L, Barbugli PA, Klein MI. Dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* exhibit more biomass and are mutually beneficial compared with single-species biofilms. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1):1581520. doi: 10.1080/20002297.2019.1581520.
18. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* 2018 Oct;6(5):10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
19. Liu JF, Hsu CL, Chen LR. Correlation between salivary *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and the severity of early childhood caries. *J Dent Sci.* 2019;14(4):389–94. doi: 10.1016/j.jds.2019.06.003.
20. Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Santana R, Herrera CL, et al. Detección Molecular de *Streptococcus Cariogénicos* en Saliva. *Int J Morphol.* 2008;26(4):951–8. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v26n4/art27.pdf>.
21. Linossier A, Vargas A, Zillmann G, Arriagada M, Rojas R, Villegas R. [Streptococci mutans: a semi-quantitative method to assess the risk to oral infection in preschool Chilean children]. *Rev Med Chil.* 2003;131(4):412–8.
22. Sharma M, Pandit IK, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M. A Comparative Evaluation of Efficacy of *Streptococcus mutans* Counts in Saliva: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2018;11(2):94–9. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1492.
23. Kämppi A, Tanner T, Päckilä J, Patinen P, Tjäderhane L, Anttonen V. Comparison of simple screening criteria with the International Caries Detection and Assessment System classification in determining restorative treatment need. *Int Dent J.* 2016;66(2):63–70. doi: 10.1111/idj.12204.
24. Thomas Sebastian S, Lecturer S, Johnson T. International caries detection and assessment system (ICDAS): an integrated approach. *Int J Oral Heal Med Res.* 2015;2(3):81–4. Disponible en: [http://www.ijohmr.com/upload/International%20Caries%20Detection%20and%20Assessment%20System%20\(ICDAS\).pdf](http://www.ijohmr.com/upload/International%20Caries%20Detection%20and%20Assessment%20System%20(ICDAS).pdf).
25. González-Martínez F, Sánchez-Pedraza R, Carmona-Arango L. Indicadores de Riesgo para la Caries ental en Niños Preescolares de La boquilla Cartagena. *Rev Salud Publica.* 2009;11(4):620–30. doi: 10.1590/S0124-00642009000400013
26. Serrano-Piña R, Aguilar-Ayala FJ, Scougall-Vilchis RJ, Trujillo-Güiza ML, Mendieta-Zerón H. Prevalence of Obesity in Elementary School Children and its Association with Dental caries. *Oral Health Prev Dent.* 2020;18(1):35–42. doi: 10.3290/j.ohpd.a43366.
27. Chaple-Gil A, Gispert-Abreu E. “Amar” el índice de O’Leary. *Rev Cuba Estomatol.* 2019;56(4):1–5. Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2154/1612>.
28. Córdoba-Urbano DL, Portilla-Cabrera MI, Arteaga-Caiza GA. Higiene oral de niños, adolescentes y jóvenes con discapacidad cognitiva leve. *Univ Salud.* 2010;1(12):34–42. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v12n1/v12n1a05.pdf>.
29. Pitts NB, Ismail A, Martignon S, Ekstrand K, Douglas G, Longbottom C. Guía ICCMSTM para clínicos y educadores. King’s College London. 2014. Disponible en: <https://www.iccms-web.com/uploads/asset/5928471279874094808086.pdf>
30. Lopera-Ossa M, Cardeño-Chaverra V, Muñetones-Correa D, Serna-Salazar E, Díaz-Garavito M, Bermúdez-Reyes P. Manejo de la conducta del paciente pediátrico por estudiantes de la Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín, 2012. *Rev Nac Odontol.* 2013;9(16):59–5. doi: 10.16925/od.v9i16.11.
31. Arango de la Cruz M, Velasco-Benítez C, López-López P. Dental caries prevalence in children and youths with vertically-transmitted HIV/AIDS from the pediatric HIV clinic (Cali, Colombia) and its relationship with biological factors, 2013. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia.* 2018;29(2):e02. doi: 10.17533/udea.rfo.v29n2a2.
32. Leal SC, Mickenautsch S. Salivary streptococcus mutans count and caries outcome—a systematic review. *J Minim Interv Dent.* 2010;3(4):137–147. Disponible en: http://reference.sabinet.co.za/sa_epublication_article/mident_v3_n4_a1%5Cnhttp://www.miseeq.com/e-3-4-1.pdf
33. Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19(2):141–7. doi: 10.1111/j.1365-263X.2008.00942.x.
34. Chokshi A, Mahesh P, Sharada P, Chokshi K, Anupriya S, Ashwini BK. A correlative study of the levels of salivary *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Actinomyces* with dental caries experience in subjects with mixed and permanent dentition. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20(1):25–8. doi: 10.4103/0973-029X.180916.
35. Nanda J, Sachdev V, Sandhu M, Deep-Singh-Nanda K. Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts using saliva and plaque as microbial risk indicators in 3-8 year old children. A cross sectional study. *J Clin Exp Dent.* 2015;7(1):e114-8. doi: 10.4317/jced.51814.
36. Walsh LJ. Aspectos clínicos de biología salival para el clínico dental. *J Minim Interv Dent.* 2008;1(1):5–24. Disponible en: <http://www.miseeq.com/s-1-1-2.pdf>
37. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1028–37.
38. Zhang L, Sun T, Zhu P, Sun Z, Li S, Li F, et al. Quantitative Analysis of Salivary Oral Bacteria Associated with Severe Early Childhood Caries and Construction of Caries Assessment Model. *Sci Rep.* 2020;10(1):6365. doi: 10.1038/s41598-020-63222-1.
39. Colombo NH, Kreling PF, Ribas LFF, Pereira JA, Kressirer CA, Klein MI, et al. Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol.* 2017;83:282–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.08.006.
40. Singla D, Sharma A, Sachdev V, Chopra R. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque of Indian Pre-School Children Using PCR and SB-20M Agar Medium. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(11):ZC60–3. doi: 10.7860/JCDR/2016/19256.8909.
41. Abe S, Ishihara K, Adachi M, Okuda K. Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly. *Arch Gerontol. Geriatr.* 2006; 43:53–64. doi: 10.1016/j.archger.2005.09.002.