

Los tests salivares y la evaluación del riesgo microbiológico de caries

Revisión de la literatura

**E. Cuenca Sala
C. Manau Navarro
LL. Serra Magem**

Consejo Asesor sobre la Salud Dental. Generalidad de Cataluña.

Cuenca Sala E, Manau Navarro C, Serra Magem LL: Los tests salivares y la evaluación del riesgo microbiológico de caries: Revisión de la literatura. Archivos de Odonto-Estomatología 1988; 4: 211-220.

Resumen. Se hace una revisión de la literatura en relación a la historia, desarrollo y estado actual de los tests salivares de microorganismos cariogénicos.

Se mencionan las técnicas más relevantes de detección y conteo de microorganismos —Lactobacilos y E. mutans— y se destacan, tanto su fiabilidad como elemento predictivo de caries, como su facilidad de utilización clínica, no sólo para evaluar el riesgo individual de caries, sino también como elemento de motivación para los pacientes.

Palabras Clave: Tests salivares - E. Mutans-Lactobacilos-Riesgo de caries.

Aceptado para publicación:
Febrero 1988

Correspondencia:
Dr. E. Cuenca Sala,
Rosellón 257,
08008 Barcelona.

Abstract

The authors review the existing literature in relation to the history, development and present state of salivary tests of cariogenic microorganisms.

They mention the most relevant techniques of microorganism detection and reckoning (Lactobacillus and S. Mutans), emphasizing both their reliability as a predictive element for dental decay and their adaptability to clinical use, not only to evaluate individual risk of decay but also to motivate the patient.

Key Words: Salivary tests-S. Mutans-Lactobacillus-Risk of decay.

Introducción

Tradicionalmente se ha venido prestando menos atención al diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad de caries, que al diagnóstico y tratamiento de sus secuelas, es decir, las lesiones de caries.

Ello ha redundado en una mayor tecnificación de la

odontología, en detrimento de otros aspectos menos mecanicistas y más comprensivos.

En los últimos años las investigaciones sobre la enfermedad de caries, su diagnóstico y tratamiento, han permitido poner en manos del odontólogo general eficaces métodos que permiten no ya su diagnóstico precoz, sino la determinación del riesgo individual de caries del paciente.

Aunque la incidencia de caries ha disminuido en muchos países industrializados en los últimos quince años, los estudios epidemiológicos nos muestran que este declinar de caries no es uniforme entre toda la población, y que un 20 % de individuos experimenta un 60 % de los incrementos de caries (Newbrun et al. 1984). Cualquiera puede comprender que éste no es desde luego un problema teórico, sino que la identificación de los grupos o de los individuos de mayor riesgo de caries es de la mayor importancia para el odontólogo general en su propia clínica, puesto que este tipo de pacientes es el que puede presentar más problemas —si previamente no ha sido controlado— ante cualquier tipo de tratamiento, ya sea reparador, protésico u ortodóntico.

La caries dental es una enfermedad multifactorial,

pero también es una enfermedad infecciosa y oportunística. La presencia de bacterias y de una dieta rica en sacarosa son factores imprescindibles para su aparición y posterior desarrollo. Es comprensible pues que los métodos que permitan determinar porcentualmente el número de bacterias cariogénicas de un paciente, tendrán la mayor importancia para evaluar el potencial riesgo de caries de ese paciente.

En la actualidad existe un acuerdo general en considerar al lactobacilo y al *Estreptococo mutans* como los microorganismos responsables de la caries de corona. Aunque ya en 1924 Clarke aisló por primera vez el *E. mutans* en lesiones cariosas, su importancia fue ignorada hasta los años 60 en que se redescubrió su importancia en la placa bacteriana y en la iniciación de las lesiones de caries (Newbrun 1978). Por ello, durante casi 50 años se atribuyó a los lactobacilos la mayor importancia en el mecanismo etiológico de la caries. Actualmente existen evidencias que permiten afirmar la estrecha asociación del *E. mutans* con el inicio de la lesión de caries para ser ésta, posteriormente, colonizada por los lactobacilos (Bowden et al. 1984).

Puesto que la presencia de microorganismos —*E. mutans* y lactobacilos— debe preceder a la posible aparición de las lesiones de caries, la incorporación de técnicas simples y de rápida realización para medir la cantidad de bacterias cariogénicas en determinados pacientes es del mayor interés clínico como elemento de ayuda al diagnóstico de la actividad de caries de los pacientes.

La revisión de la literatura que se presenta a continuación no pretende exponer todos los métodos de cultivo que se han utilizado para la detección y recuento de *E. mutans* y lactobacilos en muestras orales, sino que se describen y discuten aquellos tests salivares que se han desarrollado con el fin específico de detectar el riesgo microbiológico de caries, incluyéndose también algunos tests que, aunque no utilizan la saliva como muestra para la determinación del riesgo de caries, son de ejecución simple para estudios clínicos y epidemiológicos y para su uso en la consulta privada.

Revisión de la literatura

Test salivares para lactobacilos

Los lactobacilos constituyen una relativamente pequeña proporción en el total de la microflora que se encuentra en la placa y saliva (Socransky 1971) y probablemente no juegan un papel importante en el inicio de la caries dental. Sin embargo, una vez la lesión se ha establecido, la proporción de lactobacilos aumenta en el conjunto de la microflora (Crossner 1981). De ahí que, en individuos con lesiones de caries sin tratar, aparezca un aumento en la proporción de lactobacilos. Así mismo, la presencia de restauraciones des-

bordantes, bandas de ortodoncia, prótesis con zonas retentivas, etc, redundan en un aumento de la colonización de lactobacilos (Krasse et al 1968). También se ha establecido una estrecha relación entre el consumo de sacarosa en la dieta y la cantidad de lactobacilos en saliva. Esta relación entre sustrato y microflora, ha sido así mismo definitivamente demostrada en la experiencia llevada a cabo en Turku por Larma y colaboradores (Larma et al 1975), mediante la utilización de sustitutivos del azúcar. En consecuencia, la proporción de lactobacilos nos permite, además, valorar el consumo de hidratos de carbono de los pacientes, a la vez que nos proporciona un elemento de gran ayuda para la motivación de los mismos.

La relación entre la proporción de lactobacilos en placa y saliva y la actividad de caries ha sido ampliamente relatada en la literatura, y el recuento de colonias de lactobacilos, o aquellas pruebas cuyo resultado está relacionado con el número de lactobacilos en saliva han sido recomendadas en muchas ocasiones como medio para predecir el riesgo de caries (Socransky 1968, Stolpe 1970, Nikiforuk 1985, Bratthall y Carlsson 1986, Jordan 1986).

Es un hecho conocido que la concentración de lactobacilos en saliva permanece bastante constante durante el día, pero esta concentración es a menudo más elevada a primera hora de la mañana, antes de desayunar y de proceder al cepillado de los dientes (Birkhed et al 1981, Krasse 1985, Bratthall y Carlsson 1986). Esto es especialmente cierto para personas con alto número de lactobacilos, y se debe tener en cuenta en la recogida de la muestra salivar, procurando, cuando se deban hacer determinaciones seriadas de un mismo paciente, recoger las distintas muestras aproximadamente en el mismo momento del día.

También se ha estudiado si el almacenamiento de las muestras de saliva antes de proceder a la inoculación del medio de cultivo afecta al recuento de lactobacilos, y se ha comprobado que un almacenamiento de la saliva de hasta 2 días a temperatura ambiente no afecta de un modo apreciable este recuento (Birkhed et al 1981).

El primer método estandarizado para el cultivo de lactobacilos fue descrito por Hadley en 1933. Esta técnica se basaba en el cultivo de los microorganismos acidófilos de la saliva en un medio de agar que contenía 40 % de jugo de tomate acidificado con ácido láctico hasta alcanzar un pH de 5. La mayor parte de los microorganismos cultivados eran lactobacilos, y eran fácilmente reconocibles en aquel medio. La técnica de Hadley se utilizó ampliamente en trabajos de investigación debido a su fiabilidad, y permitió demostrar que la población de lactobacilos refleja en general el nivel de caries dental. Sin embargo, la complejidad de la técnica impidió que fuese incorporada a la práctica clínica, ya que precisaba de la ayuda del laboratorio

(Newbrun 1978, Nikiforuk 1985, Jordan 1986).

En 1940, Snyder desarrolló un método basado en la capacidad acidogénica de las bacterias salivares en presencia de azúcar. El test de Snyder consiste en la inoculación de saliva estimulada con parafina en un medio de glucosa-agar de pH 4,7-5. Este medio contiene un indicador colorimétrico de pH, cuyo color oscila de azul-verdoso a pH 4,6-5 a amarillo a pH 4. La muestra se incuba a 37 °C y se compara con un control a las 24, 48 y 72 h. La rapidez e intensidad del cambio de color indica la capacidad de las bacterias de producir ácido y se corresponde con el recuento de lactobacilos en saliva. Una de las ventajas del test de Snyder es su simplicidad, que lo hace asequible para el uso en la práctica dental diaria (Nikiforuk 1985, Bratthall y Carlsson 1986, Jordan 1986). El test de Snyder se comparó con el cultivo de lactobacilos en placas de SL agar (Birkhed et al 1981) hallándose una buena correlación entre ambas técnicas, aunque el test de Snyder tiende a dar estimaciones del número de lactobacilos por encima de las reales. Esto puede ser debido a la actividad productora de ácido de otras bacterias distintas de los lactobacilos que pueden crecer en el medio del test de Snyder.

Más adelante, en 1951, Rogosa, Mitchell y Wiseman desarrollaron un medio altamente selectivo para el cultivo de lactobacilos (Nikiforuk 1985, Jordan 1986), conocido actualmente por el nombre de Rogosa SL-agar (Difco B 480®), (Westergren y Krasse 1978, van Houte 1981, Bratthall y Carlsson 1986). La selectividad de este medio se basa en su pH ácido y en su alto contenido de acetato y otras sales. En esta técnica, la saliva estimulada con parafina es agitada con bolas de vidrio para romper los agregados bacterianos, diluida a varias concentraciones con una solución buffer, y estas diluciones mezcladas con 10 ml de SL-agar. Las mezclas finales se vierten en placas de petri, conteniendo también 10 ml de SL-agar, que se incuban a 37 °C durante 4 días, pasados los cuales se procede al recuento de colonias de lactobacilos. El número de lactobacilos por ml de saliva se calcula multiplicando el número de colonias en las placas por el factor de dilución de la saliva. Esta técnica fue mejorada por Westergren y Krasse (Westergren y Krasse 1978), los cuales introdujeron el uso de una micropipeta que permite inocular 25 µl de cada una de las diluciones de saliva en la misma placa de petri. Este método guarda una gran correlación con el de Rogosa y colaboradores en lo que se refiere a los recuentos de lactobacilos y resulta más ergonómico al no precisar tanta cantidad de medio de cultivo y de placas; también permite inocular muestras de diferentes pacientes en la misma placa. Dado que un cálculo exacto de la concentración de bacterias en saliva no es habitualmente necesario en los cultivos rutinarios de saliva, Westergren y Krasse utilizaban una sola dilución final de saliva de 1/1000,

de la cual inoculaban 25 µl en la placa conteniendo Rogosa SL-agar. A la dilución citada, un crecimiento de 25 colonias de microorganismos corresponde a 1 millón de bacterias por ml de saliva, y si no hay crecimiento de colonias en el cultivo, ello significa menos de 40.000 bacterias por ml de saliva.

En un intento de simplificar su técnica de detección de lactobacilos para que pudiese ser usada en la práctica clínica, Rogosa y Wiseman desarrollaron un test colorimétrico muy similar al de Snyder. Este test utiliza un indicador colorimétrico de pH, el púrpura de bromocresol, y SL-agar modificado. Los cambios de color se corresponden satisfactoriamente con los recuentos de lactobacilos en placas de SL-agar (Jordan 1986).

Otro test colorimétrico para la detección de lactobacilos fue puesto a punto por Grainger, Jarret y Honey en 1965 (Nikiforuk 1985). Esta prueba presenta la novedad de que no es necesaria la recogida de saliva, lo cual la hace particularmente útil para evaluar el riesgo microbiológico de caries en niños de corta edad. En esta técnica, la muestra de flora oral se recoge pasando un aplicador con punta de algodón por las superficies vestibulares de los dientes. Este aplicador se incuba a continuación en un medio de cultivo durante 48 h, y los cambios de pH se leen con la ayuda de un aparato de medir el pH o añadiendo un indicador de color al medio de cultivo. Este test no se utiliza demasiado actualmente, pero sin embargo existe un test comercializado (Cariostat, Sankin Industry Co., Ltd.®) que se basa en una técnica similar. El Cariostat® está diseñado para medir la producción de ácido por los lactobacilos, estreptococos mutans y otras bacterias de la placa. El medio de cultivo contiene triptosa, sacarosa, un inhibidor de los Gram— y un indicador colorimétrico de pH. Se recoge la muestra de placa con un aplicador con extremo de algodón, pasándolo por la parte cervical de las superficies vestibulares de los dientes superiores, y el aplicador se inserta en un vial con el medio de cultivo, leyéndose a las 24 y 48 h. El Cariostat® es considerado por algunos autores como un buen indicador de la presencia de lesiones incipientes y del ritmo de progresión de las caries existentes (Jordan 1986).

Tal vez el método más práctico y sencillo para la detección del riesgo microbiológico de caries a partir del recuento de lactobacilos, es el desarrollado por Larmas en 1975 (Larmas 1975), comercializado con el nombre de Dentocult LB® (Orion Diagnostica). El Dentocult LB® consiste en unas láminas de plástico recubiertas de Rogosa SL-agar. La muestra de saliva estimulada con parafina se vierte por encima de la lámina de plástico, y ésta se introduce en el vial correspondiente, incubándose a 37 °C durante 4 días. Otra posibilidad es incubarla a temperatura ambiente durante 6 a 9 días. Las colonias de lactobacilos crecen sobre el medio de cultivo, y el resultado se obtiene compa-

rando la densidad en colonias bacterianas de las placas con una escala que es suministrada por el fabricante, donde aparecen los recuentos de 0-1.000, <10.000, <100.000 y >1.000.000 colonias de lactobacilos por ml de saliva. Este test es simple y fiable, y además es de fácil comprensión para el paciente, por lo cual es recomendable para uso en la práctica diaria, teniendo la ventaja adicional de que el kit comercial se puede conservar a temperatura ambiente durante un año por lo menos (Nikiforuk 1985, Bratthall y Carlsson 1986, Jordan 1986).

En un estudio de Birkhed y colaboradores (Birkhed et al 1981), el Dentocult LB[®] fue comparado con el recuento de lactobacilos en placas de SL agar y con el test de Snyder. Se encontró una gran correlación entre los resultados del Dentocult LB[®] incubado 4 días a 37 °C y el cultivo de lactobacilos en placas. Esta correlación disminuía cuando el Dentocult LB[®] se incubaba a temperatura ambiente durante 6 días, mejorando algo al alargar el tiempo de incubación a 9 días. La fiabilidad del Dentocult LB[®] incubado a temperatura ambiente parece estar en relación con la temperatura ambiental, y los autores aconsejan que, si no se dispone de estufa a 37 °C se incuba el test durante 7 días a una temperatura lo más constante posible y por encima de los 25 °C. En este estudio se comprobó también que el Dentocult LB[®] es más exacto que el test de Snyder en la estimación del número de lactobacilos en saliva.

Tests salivares y estreptococos mutans

La presencia de estreptococos mutans está asociada con el inicio de las caries de corona y caries incipientes de superficies lisas. Así mismo, estos microorganismos indican un alto riesgo de caries cuando se presentan en alta proporción (Zickert et al 1982). Por todo ello, el conocer la cantidad porcentual de estreptococos mutans en determinados pacientes, es una prueba del mayor interés para el clínico. De hecho, este tipo de pruebas es de uso habitual en países como Suecia, en donde cualquier paciente que deba ser tratado con rehabilitaciones costosas, es previamente sometido a un control de estreptococos mutans en saliva y, eventualmente, el tratamiento —financiado en muchos casos parcialmente por la Seguridad Social— no se inicia hasta conseguir que el paciente presente un porcentaje aceptable de estreptococos mutans en saliva (Krasse 1985).

Los esfuerzos para encontrar un test salivar de riesgo microbiológico de caries, basado en los porcentajes de estreptococos mutans, ha tropezado a lo largo del tiempo con las mismas dificultades que cualquier test microbiano de este tipo. A estas dificultades debe añadirse el hecho de que los estreptococos mutans constituyen por sí solos menos del 1 % del total de la

placa bacteriana, y las dificultades halladas para encontrar un medio de cultivo que permitiera el desarrollo de las diferentes cepas de estreptococos mutans. Por otra parte, los estreptococos mutans tienden a localizarse sólo en lugares específicos (fisuras oclusales, áreas interproximales), y los recuentos en saliva son incapaces de señalar tal localización o de estimar el grado de infección de un lugar específico. No obstante, no resulta práctico hacer un gran número de cultivos de diferentes localizaciones y por ello se han desarrollado los tests salivares, como una alternativa factible para la estimación de los niveles orales de estreptococos mutans (Nikiforuk 1985, Jordan 1986).

Se han desarrollado algunos tests colorimétricos basados en la actividad metabólica de los estreptococos mutans, entre los que se encuentran el Cariostat[®] (Jordan 1986), descrito en el apartado de pruebas para lactobacilos, que valora conjuntamente la capacidad acidogénica de los estreptococos mutans, lactobacilos y otras bacterias de la placa; y el test colorimétrico para estreptococos mutans de Shklair y Walter (Walter y Shklair 1982, Jordan et al 1987). Este último test, publicado en 1976, sirve para la detección preliminar de la presencia de estreptococos mutans, y utiliza muestras de placa bacteriana que se incuban a 37 °C durante 5 días en un medio de tioglicolato, lactalbúmina, manitol, acetato y un indicador colorimétrico. Se comprobó que el test colorimétrico de Shklair y Walter es razonablemente sensitivo y exacto para la detección de estreptococos mutans en muestras de placa, y por tanto útil para estudios epidemiológicos a gran escala (Walter y Shklair 1982). No obstante, los tests colorimétricos para estreptococos mutans no son muy utilizados, y la mayor parte de tests salivares para estreptococos mutans se basan en el recuento de colonias de este microorganismo.

Un test salivar simple para el recuento de estreptococos mutans se describió en 1979 (Kohler y Bratthall 1979). Este test consiste en introducir en la boca, después de inducir la formación de saliva estimulada con parafina, una espátula de madera, que luego es presionada contra la superficie de una placa conteniendo MSB-agar. El MSB-agar se prepara a partir del mitisalivarius agar (MSA), que es un medio selectivo para estreptococos, al cual se le añade una alta concentración de sacarosa (20 %) y 0,2 U de bacitracina por ml (Gold et al 1973). La bacitracina inhibe el crecimiento de la mayor parte de colonias de estreptococos distintos a los estreptococos mutans. Las placas de MSB inoculadas se incuban durante 48 h a 37 °C, en bolsas de plástico conteniendo 95 % N₂ y 5 % CO₂. Se ha comprobado que el simple aire espirado es suficientemente rico en CO₂ como para hacer innecesaria la mezcla gaseosa antes indicada, de modo que basta con «inflar» soplando la bolsa de plástico que contiene las placas de petri antes de sellarla. Niveles

de estreptococos mutans mayores de 100.000 por ml de saliva indican un riesgo microbiológico de caries alto. Este método se ha demostrado comparable a otros métodos convencionales de cultivo de estreptococos mutans, y es particularmente útil en niños pequeños, en los que la recolección de saliva puede ser difícil (Nikiforuk 1985, Jordan 1986).

Otro método de cultivo de estreptococos mutans a partir de muestras de saliva fue descrito por Westergren y Krasse (Westergren y Krasse 1978), y ha sido descrito en el apartado anterior a propósito de los cultivos de lactobacilos. En esta técnica, las muestras de 25 μ l de saliva estimulada son inoculadas en placas conteniendo MSB-agar, e incubadas como en el método de Kohler y Bratthall. La correlación entre los cultivos convencionales y esta microtécnica se demostró buena.

Uno de los principales problemas de los tests salivares para estreptococos mutans se encuentra en que la bacitracina que debe contener el medio de cultivo es inestable en solución, por lo que los medios preparados con bacitracina añadida tienen una duración muy limitada. Por ello la investigación se ha orientado hacia la consecución de medios de cultivo donde la bacitracina no está hidratada hasta el momento del uso. Uno de estos métodos (Jordan 1981) consiste en una almohadilla de tejido absorbente saturado con MSB-agar deshidratado, la cual lleva incorporada una membrana filtro. Cuando esta almohadilla se sumerge en saliva estimulada diluida, se produce una rehidratación del MSB-agar, y se permite el crecimiento de los estreptococos mutans que se han impactado en el filtro. Se ha demostrado una alta correspondencia entre los recuentos de estreptococos mutans obtenidos por este método y los resultantes de otras técnicas.

Matsukubo y colaboradores, basándose en el test de adherencia de los estreptococos mutans a las superficies de vidrio en presencia de sacarosa, desarrollaron otro test salivar que permita un tiempo de almacenamiento de hasta 15 meses (Newbrun et al 1984, Jordan 1986). Para ello utilizaron papel de filtro al cual incorporaron bacitracina y otras sustancias, desecándolo para su almacenamiento. En el momento de realizar el test salivar, estos filtros se añaden al vial conteniendo MSB en forma de caldo de cultivo. Para este test son necesarios 0,1 ml de saliva estimulada con parafina que se inoculan al vial conteniendo el caldo de cultivo de mitis-salivarius-sacarosa-bacitracina (MSB). El total se incuba a 37 °C en posición casi horizontal. A las 24 h se mueve suavemente el vial para que los depósitos bacterianos que no estén firmemente adheridos a la superficie de vidrio se desprendan, y la lectura se hace por comparación con una escala que facilita el fabricante. Newbrun y colaboradores (Newbrun et al 1984) compararon esta prueba con el test de Kohler y Bratthall que hemos descrito anteriormente, hallando resultados muy similares con ambos métodos.

Según los autores, la posibilidad de almacenamiento y la no necesidad de un laboratorio microbiológico hace que este test de adherencia modificado de Matsukubo sea más útil para uso en la consulta privada, mientras que la prueba de Kohler y Bratthall puede ser más adecuada para estudios epidemiológicos en los que se efectúan un gran número de tests en el mismo día, y para niños de corta edad.

En los últimos años, se han comercializado algunos tests salivares para detectar estreptococos mutans, de muy sencillo uso clínico. En 1984, Alauusua y colaboradores desarrollaron el Dentocult SM[®] (Orion Diagnostica) (Alauusua et al 1984). En esta prueba, una lámina de plástico cubierta de mitis-salivarius-sacarosa-agar (MSB-agar sin bacitracina) es inoculada con saliva estimulada con parafina que se vierte sobre ella. Sobre esta placa inoculada se colocan dos tabletas de bacitracina, a una distancia de unos 2 cm una de otra, y después se coloca en un vial cerrado, añadiéndole una tableta productora de CO₂. La muestra se incuba a 37 °C durante 5 días. El resultado se mide por el crecimiento de colonias de estreptococos mutans en la zona que rodea los discos de bacitracina, comparándolo con una escala. El Dentocult SM[®] se puede conservar varios meses a temperatura ambiente, es de simple manejo, y sus resultados son de fácil comprensión para los pacientes, por lo que resulta práctico para usarlo en la consulta dental como elemento diagnóstico del riesgo de caries y como auxiliar en la motivación de los pacientes.

Otro test similar es el Cariescreen SM[®] (APO Diagnostic, Inc.) (Jordan et al 1986, Jordan et al 1987). En esta prueba, una tableta de bacitracina se diluye en un vial que contiene una solución salina tamponada, y en este mismo recipiente se recoge la saliva estimulada con parafina. Una lámina de plástico recubierta de mitis-salivarius-sacarosa-agar se sumerge brevemente en la saliva diluida y después se coloca en un segundo vial, al cual se añade una tableta productora de CO₂ que se humedece con dos gotas de agua, tapándose luego el vial herméticamente. La muestra se incuba durante 48 h a 37 °C más un día a temperatura ambiente, y los resultados se comparan con una escala de densidad de colonias bacterianas. El límite mínimo de detección está en las 1.000-10.000 de colonias de estreptococos mutans por ml de saliva, que se considera representa un bajo riesgo microbiológico de caries. El límite más alto de cuantificación para el Cariescreen SM[®] es 100.000-1.000.000 de colonias por ml, lo cual sería indicativo de un nivel elevado de infección por estreptococos mutans. Entre estos dos extremos, máximo y mínimo, el test es cuantitativo, lo cual permite seguir los cambios microbiológicos en los pacientes durante programas preventivos. Los resultados obtenidos con estos tests salivares se corresponden muy bien con los de métodos convencionales, y los

kits comerciales tienen una duración adecuada para almacenarlos en la clínica dental hasta que se precisen.

Valor de los tests salivares para el diagnóstico del riesgo microbiológico de caries en el control de la caries dental

La relación entre E. mutans, lactobacilo y caries dental ha sido ampliamente estudiada y demostrada (Newbrun 1978, Hamada y Slade 1980, van Houte 1980, Bowden et al 1983, Edwardson 1986), y una revisión del tema queda fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, es necesario plantearse hasta qué punto hay una correspondencia entre la concentración de dichos microorganismos en saliva y el riesgo de caries, ya que en la aceptación de esta relación se basa la utilidad de los tests salivares como elemento diagnóstico del riesgo microbiológico de caries.

En primer lugar, es necesario especificar lo que se entiende por riesgo microbiológico de caries, y diferenciarlo del concepto de susceptibilidad a la enfermedad de caries y del concepto de actividad de caries.

El riesgo microbiológico de caries viene dado por la cantidad de bacterias cariogénicas que alberga la boca de un individuo y por las condiciones ambientales que permiten la producción de ácido por dichas bacterias. La susceptibilidad a la enfermedad de caries es la propensión inherente del huésped y de sus dientes a sufrir el proceso de la caries. Una persona muy susceptible a la caries, puede ser afligida por ésta a pesar de tener un número muy bajo de bacterias cariogénicas y una ingesta mínima de azúcar, es decir, las caries aparecerán con un riesgo microbiológico de caries bajo. Por el contrario, un diente muy resistente a la caries, por ejemplo por la acción del flúor, puede resistir una agresión microbiana importante sin por ello padecer caries. La actividad de caries, es decir, la aparición de nuevas lesiones en un individuo, vendrá dada pues, no sólo por el número y actividad de las bacterias cariogénicas que tenga en la placa y la ingesta de hidratos de carbono, sino también por la susceptibilidad individual (Nikiforuk 1985).

Por lo tanto, los tests microbiológicos para detectar el riesgo de caries nos valoran hasta qué punto los factores ambientales (cantidad de bacterias, proporción de los diferentes microorganismos y oferta de sustrato capaz de inducir la producción de ácido, etc) favorecen la probabilidad de aparición de nuevas lesiones de caries.

Una vez establecido lo que se entiende por riesgo microbiológico de caries, vamos a analizar hasta qué punto son fiables los tests salivares expuestos en esta revisión para medir dicho riesgo, así como su relación con la actividad de caries real en individuos o grupos de población y su valor para predecir futura aparición de caries, motivar a los pacientes y monitorizar la efi-

cacia de las acciones preventivas.

Relación entre los tests salivares y el índice de caries

En 1977, Klock y Krasse (Klock y Krasse 1977) estudiaron en 646 niños de 6-12 años, la correlación entre el recuento de colonias de lactobacilos y estreptococos mutans y el número de lesiones de caries (caries sin tratar y obturaciones) presentes en el momento de la toma de muestras salivares, hallando una relación positiva entre estos parámetros. Resultados similares de relación entre recuentos de colonias de lactobacilos y estreptococos mutans en placas de agar y el índice CAOS fueron hallados por Zickert y colaboradores en 101 niños de 13-14 años (Zickert et al 1982). Una relación positiva entre presencia o ausencia de estreptococos mutans en muestras de placa y actividad de caries se encontró igualmente en un estudio en adultos (Walter y Shklair 1982).

Valor predictivo de los tests salivares

Una vez establecida la relación entre el recuento de estreptococos mutans y lactobacilos y la presencia de caries en el estudio antes citado, Klock y Krasse (Klock y Krasse 1977) volvieron a examinar a los niños a los dos años, para determinar el valor predictivo de estas pruebas. Los autores no pudieron demostrar que el recuento de lactobacilos tuviese valor predictivo sobre el incremento de nuevas lesiones.

En contraste con el estudio de Klock y Krasse, un estudio de Crossner (Crossner 1981) en 115 niños de 14 años, utilizando el Dentocult LB[®], encontró que el recuento de lactobacilos tenía valor en la predicción de nuevas lesiones de caries. La diferencia entre ambos estudios puede deberse al hecho de que el estudio de Crossner era en niños que habían recibido tratamiento dental previamente, por lo que no se encontraban lesiones de caries abiertas en el momento de la toma de la muestra. Es bien sabido que la presencia de lesiones sin tratar y otros factores retentivos aumenta el recuento de lactobacilos (Krasse et al 1968, Bratthall y Carlsson 1986).

En el trabajo de Crossner, se consideró como grupo de riesgo a aquellos niños con un recuento de lactobacilos de 100.000 lactobacilos/ml o más. De los 20 niños incluidos en este grupo, 17 (85 %) desarrollaron un mayor número de lesiones en las 64 semanas del estudio que la media para todos los niños. Por otra parte, de los 87 niños con un recuento de 10.000 lactobacilos/ml de saliva o menos, 70 (80 %) desarrollaron menos lesiones que la media, y sólo 17 (20 %) se demostraron como de alto riesgo. Esto corresponde a una sensibilidad del test de un 50 % y una especificidad del 80 %. Si además de considerar el recuento de lactobacilos, se consideraba la actividad de caries

en el momento de la toma de la primera muestra (CAOS), era posible predecir más exactamente la aparición de nuevas lesiones, aunque hay que notar que también se consideraban más pacientes de alto riesgo que luego resultaban no serlo, es decir, aumentaba la sensibilidad del test pero disminuía su especificidad.

En un estudio retrospectivo (Newbrun et al 1984), se encontró que un 44 % de los niños con altos recuentos de estreptococos mutans había tenido un incremento de caries de 5 ó más CAOS en los últimos 4 años, mientras que el 60 % de los niños con recuentos bajos de estreptococos mutans sólo había tenido 0 ó 1 CAOS nueva en 4 años. En éste, como en la mayoría de los estudios que cometamos, se demostró que el valor predictivo de los tests salivares es mayor para diagnosticar los pacientes de bajo riesgo que los de alto riesgo.

Otro estudio (Zickert et al 1985) de 42 niños de 13-14 años, seguidos durante 5 años, demostró que el 57 % de niños con un recuento de >100.000 lactobacilos/ml de saliva resultaban ser pacientes de alto riesgo (sensibilidad 57 %), mientras que el 91 % de aquéllos con recuentos menores de 100.000 no se incluían en dicho grupo (especificidad 91 %). Por lo que respecta a los recuentos de estreptococos mutans, este mismo estudio demostró que el valor de predicción de un recuento de $>1.000.000$ de estreptococos mutans/ml de saliva era también elevado (sensibilidad 71 %, especificidad 91 %). Cuando los dos recuentos se consideraban conjuntamente, el valor diagnóstico de riesgo-no riesgo de caries era aún mayor.

El valor predictivo de caries de los recuentos de lactobacilos y estreptococos mutans, solos o en combinación con otros parámetros, ha sido estudiado también en niños de corta edad (Schroder y Edwardsson 1987). En este estudio se valoró la higiene oral, expresada por el estado gingival, los hábitos dietéticos, y la presencia/ausencia de lactobacilos y estreptococos mutans en una muestra de 133 niños de 3 años de edad. Se halló que la presencia/ausencia de lactobacilos estaba altamente relacionada con la presencia de caries (LB+: \cos 5,9; LB—: \cos 0,85). La relación estreptococos mutans-caries dental no es tan buena en este grupo de edad. El valor del recuento de lactobacilos en la predicción de la actividad de caries era mayor si se combinaba con el recuento de estreptococos mutans o con los índices salud gingival y hábitos dietéticos.

Los tests salivares como elemento de motivación del paciente

Crossner y Unell (Crossner y Unell 1986) utilizaron el Dentocult LB® para la determinación del riesgo microbiológico de caries como un elemento de diagnóstico precoz y motivación del paciente para la preven-

ción de la caries dental. En este estudio, se tomaron tres grupos de niños de 13 años de media. En un grupo se tomaron 6 muestras de saliva a intervalos regulares durante los 30 meses del estudio, siendo informados los niños de los resultados del recuento de lactobacilos después de cada muestra, y utilizando ésta como un medio de motivación para el control personal de la higiene oral y la dieta. En otro grupo se siguió la misma pauta y además aquellos niños con recuentos de lactobacilos >100.000 /ml de saliva recibieron tratamiento preventivo adicional. Por último, el grupo control sólo paso por el primer control de lactobacilos, sin ser informado de los resultados, y recibiendo únicamente el tratamiento preventivo de rutina del programa escolar sueco. En el tiempo del estudio, el grupo control experimentó una media de 5 nuevas superficies cariadas, mientras que los dos grupos experimentales sólo incrementaron algo más de 2 superficies por niño. Esto significa que la motivación para el cuidado personal en casa (higiene oral, control de la ingesta de azúcar) conseguido se tradujo en una reducción de casi el 50 % del incremento de caries. Sin embargo, no se hallaron diferencias entre los dos grupos experimentales en lo que a incremento de caries se refiere. Parece sorprendente que aquellos niños que además de motivación recibieron tratamiento preventivo adicional en el caso de recuentos altos de lactobacilos, no demostrasen menor incremento de caries que los que sólo recibieron motivación. Una posible explicación puede ser que el programa preventivo en las escuelas suecas es ya tan completo, que el añadir 1 ó 2 visitas de la higienista dental para educación dietética, refuerzo de higiene oral y aplicación de barniz de flúor, no significa una diferencia apreciable con el programa rutinario seguido por los demás niños.

El poder de motivación de los tests salivares ha sido utilizado intensamente por Krasse y sus colaboradores en las experiencias llevadas a cabo en el Departamento de Cariología de la Universidad de Goteburgo, consiguiendo reducciones importantes en la incidencia de caries y en los recuentos de microorganismos a través de medidas preventivas profesionales y personales de los pacientes (Krasse 1985).

Los tests salivares como método para la indicación y monitorización de las medidas preventivas de caries

El número de estreptococos mutans en saliva fue examinado en 101 niños de 13-14 años de edad, 53 en el grupo control y 48 en el grupo experimental. Todos los niños del grupo experimental con recuentos de más de 250.000 estreptococos mutans/ml de saliva fueron tratados con gel de clorhexidina al 1 % una vez al día durante 14 días, con lo cual el número de estreptococos mutans se redujo ampliamente. Se procedió al sellado de fisuras de todos los molares y pre-

molares libres de caries para evitar reinfección por estreptococos mutans.

Muestras de saliva fueron examinadas en el grupo experimental cada 4 meses, y todos los niños con niveles de estreptococos mutans mayores de 250.000/ml de saliva fueron tratados nuevamente con clorhexidina. A los 3 años de la iniciación del estudio, los niños del grupo control presentaron una media de 9,6 nuevas caries, y los del grupo experimental 4,2. Si se comparan los niños de ambos grupos que presentaban recuentos de estreptococos mutans de 1.000.000 al principio del estudio, los incrementos de caries fueron de 20,8 nuevas caries en los del grupo control y 3,9 en el grupo experimental. Los resultados de este estudio demuestran que los recuentos de estreptococos mutans son un método fiable para indicar la necesidad de las prácticas preventivas, y que es posible controlar el riesgo microbiológico de caries por medio de los procedimientos preventivos a nuestro alcance (Zickert et al 1982).

Cuando 83 de los 101 niños del estudio anterior (Zickert et al 1982) fueron examinados a los dos años de finalizar el programa expuesto, se encontró que tanto los chicos del grupo control, como los del grupo experimental, habían vuelto a los niveles de lactobacilos y estreptococos mutans que tenían antes de la iniciación del estudio. La actividad de caries era similar en ambos grupos, aunque menor en todos los casos al incremento de caries observado durante los años del experimento, sobre todo en el grupo control. Los sujetos con un recuento de estreptococos mutans > 1.000.000/ml de saliva continuaron mostrando un incremento de caries más elevado que los que presentaban niveles más bajos de estreptococos mutans. Durante los dos años posteriores al programa experimental, todos los chicos siguieron el programa escolar rutinario para la prevención y tratamiento de caries. Estos resultados demuestran: 1) que el tratamiento y prevención convencionales tienen muy poco efecto sobre la infección por estreptococos mutans; 2) que aunque la clorhexidina se ha demostrado eficaz en la reducción de los recuentos de estreptococos mutans, éstos vuelven a los niveles iniciales en un plazo de 3-6 meses si la ingesta de sacarosa no se reduce; 3) que en ausencia de medidas antimicrobianas (clorhexidina, control de la dieta), los niveles de estreptococos mutans son estables a lo largo del tiempo, pudiendo tratarse de una propiedad característica del individuo; y 4) que los niveles de lactobacilos también permanecen estables si no hay cambios importantes en la dieta (Zickert et al 1987).

Sin embargo, hay que constatar que, aunque el incremento de caries en los dos años posteriores al experimento fue similar en ambos grupos, los niños con alto recuento de estreptococos mutans del grupo experimental entraron en este periodo con unos niveles más bajos de caries que los del grupo control, debido

a las acciones preventivas extraordinarias que recibieron (Clorhexidina), y no perdieron esta ventaja durante los dos años posteriores al programa (Zickert et al 1983, Zickert et al 1987). Todo ello nos indica que el efecto de las medidas profilácticas intensivas se mantiene a largo plazo. Esto es especialmente interesante cuando se incide con dichas medidas profilácticas durante las épocas en que la susceptibilidad del diente es mayor, lo que corresponde a los primeros 2-4 años después de la erupción.

El efecto a largo plazo de la profilaxis intensiva de caries, y el valor de los tests salivares de riesgo microbiológico de caries en la predicción del incremento de caries y en la indicación de medidas preventivas extraordinarias, fue también demostrado por Klock (Klock 1984) en un estudio de 7 años de duración. En este estudio se determinó el riesgo de caries a partir del recuento de estreptococos mutans y lactobacilos, y se establecieron tres grupos de alto riesgo y dos de bajo riesgo. Un grupo en cada nivel de riesgo fue tomado como control, recibiendo únicamente el programa escolar convencional. Los otros niños de los grupos de alto y bajo riesgo recibieron medidas profilácticas intensivas en forma de profilaxis profesionales frecuentes (1-2 por mes), motivación, sellados de fisuras y aplicación tópica de flúor. A los dos años de seguir este régimen preventivo, se encontró que en los niños de bajo riesgo los niveles de nuevas caries eran similares entre los niños que habían recibido las medidas preventivas extraordinarias y los que no (2,11 CAOS y 2,04 CAOS respectivamente). Sin embargo, en los niños de alto riesgo había diferencias apreciables del incremento de caries entre los que habían seguido el régimen preventivo intenso (2,16-2,65 CAOS) y los controles (3,50 CAOS). A partir de este momento, todos los niños dejaron de recibir programa extraordinario alguno, y fueron examinados de nuevo 5 años después (es decir, a los 7 años de la iniciación del estudio). Los resultados demostraron que el incremento de caries fue similar en los niños de bajo riesgo que en los de alto riesgo que habían seguido el programa profiláctico intenso (entre 2,23 y 2,94 CAOS), mientras que los niños de alto riesgo que no habían recibido ningún programa preventivo especial presentaron un incremento de caries doble al de los demás (5,30 CAOS).

Importancia de la identificación de los individuos con riesgo elevado de caries

Mientras está demostrado que los programas preventivos intensivos son muy eficaces en la reducción de caries en los niños, se ha visto también que resultan extremadamente costosos. Por ello es de particular importancia el poder diagnosticar cuáles son los pacientes con un alto riesgo de caries a fin de establecer estos programas sólo para ellos. El costo-efectividad de los programas profilácticos extraordina-

rios es aún mejor al haberse demostrado su efecto a largo plazo. Los tests salivares para el diagnóstico del riesgo de caries son eficaces en la detección de los pacientes de alto riesgo. Si se incide sobre estos pacientes en los períodos en que el diente es más susceptible a la caries se consigue la máxima efectividad del programa preventivo. En conclusión, se debe identificar a los niños de alto riesgo, y establecer los programas preventivos tan pronto como sea posible después de la erupción de los dientes.

Los tests salivares no son únicamente utilizables para el diagnóstico de riesgo de caries en niños y la instauración de las correspondientes pautas preventivas, sino que también son eficaces en la indicación y programación de los diversos tratamientos dentales en adultos (Krasse 1985). Un requisito imprescindible para un tratamiento adecuado es establecer un diagnóstico correcto, y ello debe incluir la determinación del riesgo de caries cuando sea procedente. En pacientes que acuden a la consulta dental para tratamiento de caries o rehabilitaciones orales, un nivel bajo de riesgo de caries determinado por las características, incremento y número de las lesiones cariosas, y por los tests salivares, nos indicará que proceder únicamente al tratamiento sintomático es adecuado. Por el contrario, si el mismo paciente presenta un riesgo de caries alto, la causa de la enfermedad de caries debe ser tratada antes de proceder al tratamiento rehabilitador o conservador. Este tratamiento causal de la enfermedad consistirá en cambios en la dieta, higiene oral, tratamiento con clorhexidina, flúor tópico, estimulación de la secreción salivar, etc, y sus efectos pueden ser monitorizados a partir de los tests salivares para lactobacilos y estreptococos mutans, así como otros que miden el volumen y la capacidad buffer de la saliva.

Como se ha visto en muchos estudios (Zickert et al 1982, Nikiforuk 1985, Krasse 1985, Bratthall y Carlsson 1986, Jordan 1986, Zickert et al 1987), los porcentajes de estreptococos mutans se pueden disminuir apreciablemente con el uso de flúor tópico y clorhexidina, pero requieren una reducción de la ingesta de sacarina para mantenerse bajos. Así mismo, los niveles de lactobacilos están asociados con la ingesta de carbohidratos. Los recuentos de estreptococos mutans y lactobacilos también se pueden reducir por la eliminación de lesiones de caries abiertas, sellado de fisuras, eliminación de zonas retentivas y medidas de higiene oral. De todo ello se puede concluir que los tests salivares para la estimación de lactobacilos y estreptococos mutans son un método adecuado y objetivo para el control de los efectos del tratamiento etiológico de la enfermedad de caries en los pacientes de alto riesgo.

Conclusiones

1) Diversos métodos han sido estudiados para de-

terminar de forma fiable el riesgo de caries individual. Algunos, como la valoración de la historia de caries del individuo en relación a su riesgo futuro, se han revelado de bajo valor predictivo cuando se utilizan aisladamente.

En cambio, la utilización de tests salivares para medir la proporción de microorganismos cariogénicos, permite disponer de un elemento de considerable valor predictivo en el riesgo individual de caries.

2) Las dificultades que en un principio presentaban este tipo de tests salivares, los hacían engorrosos y, en la práctica, de difícil utilización clínica.

En la actualidad, se dispone de tests salivares, tanto para medir lactobacilos como *E. mutans*, que a su facilidad de manejo unen unos niveles de exactitud que los hacen aceptables para su uso en clínica.

3) El valor predictivo del riesgo de caries se aumenta cuando se realizan al mismo paciente los dos tests lactobacilos y *E. mutans*.

4) A pesar de que numerosos estudios muestran una correlación entre elevados porcentajes de microorganismos cariogénicos en saliva y riesgo de caries, este tipo de pruebas debe ser considerado como un elemento diagnóstico más en el conjunto de signos clínicos del paciente, en relación a su riesgo de caries.

5) Los tests salivares de microorganismos cariogénicos son además un elemento importante para la motivación de algunos pacientes, tanto en relación a su control de placa bacteriana, como de dieta rica en sacarina.

Bibliografía

- Alaauusua S, Savolainen J, Tuompo H, Gronroos L. Slide-scoring method for estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *Scand J Dent Res* 1984; 92: 127-133.
- Birkhed D, Edwardsson S, Andersson H. Comparison among a dip-slide test (Dentocult), plate count and Snyder test for estimating number of lactobacilli in human saliva. *J Dent Res* 1981; 60: 1832-1841.
- Bowden GH, Miles AR, Boyar R. *Streptococcus mutans* and caries: state of the Art 1983. En: Guggenheim B, ed. *Cariology Today*. Karger, Basilea 1984: 173-181.
- Bratthall D, Carlsson J. Current status of caries activity tests. En: Thylstrup A, Fejerskov O, eds. *Textbook of Cariology*. Munksgaard, Copenhagen 1986; 249-265.
- Crossner CG. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Community Dent Oral Epidemiol* 1981; 9: 182-190.
- Crossner CG, Unell L. Salivary lactobacillus counts as a diagnostic and didactic tool in caries prevention. *Community Dent Oral Epidemiol* 1986; 14: 156-160.
- Edwardsson S. Microorganisms associated with dental caries. En: Thylstrup A, Fejerskov O, eds. *Textbook of Cariology*. Munksgaard, Copenhagen 1986; 107-130.
- Gold OG, Jordan HV, van Houte JA. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1357-1364.
- Hamada S, Slade HD. Biology, Immunity and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Reviews* 1980; 44: 331-384.
- Jordan HV. Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 23-27.

- Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel MA. A diagnostic kit for detection and enumeration of *Streptococcus mutans* in oral samples. *J Dent Res* 1986; 65: Specc Issue. Abstr. No. 996.
- Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel MA. Simplified Diagnostic System for Cultural Detection and Enumeration of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1987; 66: 57-61.
- Jordan HV, Leahy TJ. Quantitation of *Streptococcus mutans* in oral samples using the membrane filter technique. *J Dent Res* 1981; 60: Specc Issue. Abstr. No. 485.
- Klock B. Long-term effect of intensive caries prophylaxis. *Community Dent Oral Epidemiol* 1984; 12: 69-71.
- Klock B, Krasse B. Microbial and salivary conditions in 9-12-year old children. *Scand J Dent Res* 1977; 85: 56-63.
- Kolher B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 584-588.
- Krasse B. Caries risk. A practical guide for assessment and control. Quintessence Publishing Co., Inc, Chicago 1985.
- Krasse B, Jordan HV, Edwardsson S, Svensson I, Trel L. The occurrence of certain «caries-inducing» streptococci in human dental plaque material. *Arch Oral Biol* 1968; 13: 911-918.
- Larmas M. Simple tests for caries susceptibility. *Internat Dent J* 1985; 35: 109-117.
- Larmas M, Makinen K, Scheinin A. Turku sugar studies. VIII. Principal microbiological findings. *Acta Odont Scand* 1975; 33: Suppl 70: 173-216.
- Newbrun E. *Cariology*. Williams & Wilkins, Baltimore 1978.
- Newbrun E, Matsukubo T, Hoover C. Comparison of two screening tests for *Streptococcus mutans* and evaluation of their suitability for mass screenings and private practice. *Community Dent Oral Epidemiol* 1984; 12: 325-331.
- Nikiforuk G. *Understanding Dental Caries*. 2 Prevention. Basic and clinical aspects. Karger, Basilea 1985.
- Schroder U, Edwardsson S. Dietary habits, gingival status and occurrence of *Streptococcus mutans* and lactobacilli as predictors of caries in 3-year-olds in Sweden. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 320-324.
- Socransky SS. Caries-susceptibility tests. *Ann NY Acad Sci* 1968; 153: 137-146.
- Socransky SS, Manganiello S. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol* 1971; 9: 182-190.
- Stolpe JR. Chemical and bacteriological tests for determining susceptibility to, and activity of dental caries. A review. *J Pub Health Dent* 1970; 30: 141-155.
- van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Internat Dent J* 1980; 30: 305-326.
- van Houte J, Aasenden R, Peebles TC. Lactobacilli in human dental plaque and saliva. *J Dent Res* 1981; 60: 2-5.
- Walter RG, Shklair IL. *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active Naval Recruits. *J Dent Res* 1982; 61: 1229-1232.
- Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 82-83.
- Zickert I, Emilson C-G, Krasse B. (a). *Streptococcus mutans*, lactobacilli and dental health in 13-14-year-old Swedish children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1982; 10: 77-81.
- Zickert I, Emilson C-G, Krasse B. (b). Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 861-863.
- Zickert I, Emilson C-G, Krasse B. Prediction of caries incidence based on salivary *Streptococcus mutans* and lactobacillus counts. *J Dent Res* 1985; 64: Specc Issue. Abstr. No. 1545.
- Zickert I, Emilson C-G, Krasse B. Microbial conditions and caries increment 2 years after discontinuation of controlled antimicrobial measures in Swedish teenagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1987; 15: 241-244.