

형광 차이를 이용한 세균성 치아 침착물의 성숙도 구별

¹연세대학교 치과대학 예방치과학교실, BK21 플러스 통합구강생명과학 사업단, ²Department of Health Services Research, University of Liverpool, ³Inspektor Research Systems BV, ⁴강남베스트덴 치과의원
조무열¹, 이은송¹, Elbert de Josselin de Jong^{1,2,3}, 윤홍철⁴, 김백일¹

ABSTRACT

Classification of maturation of bacterial dental deposits using differences in fluorescence intensity

¹Department of Preventive dentistry & Public Oral Health, BK 21 PLUS Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea, ²Department of Health Services Research, University of Liverpool, ³Inspektor Research Systems BV, ⁴Kangnam Bestden dental clinic

Mu-Yeol Cho¹, Eun-Song Lee¹, Elbert de Josselin de Jong^{1,2,3}, Hong-Chul Yoon⁴, Baek-Il Kim¹

Purpose: The aim of this study was to evaluate the red fluorescence characteristics of bacterial dental deposits assessed by quantitative light-induced fluorescence (QLF) technology and confirm whether the red fluorescence can distinguish and evaluate quantitatively accumulation of bacterial dental deposits.

Methods: This retrospective cross-sectional study used QLF images captured at a dental clinic from January to December 2016. In each QLF image, a skilled examiner selected one region where the presence of deposits was suspected. Then, the regions were classified into three groups of not detectable deposits(ND), half detectable deposits (HD), and full detectable deposits (FD) by two examiners according to classification criteria. Only those images where the regions of bacterial dental deposits were classified identically by all examiners were used for analysis. The mean red fluorescence intensity (RFI) was defined as the mean value of R/G for all pixels in the regions. The RFI was compared between groups using Welch's ANOVA test, and the Spearman correlation was calculated to assess the association between RFI and accumulation of deposits.

Results: In this study, 351 images among the collected images of 605 subjects were finally selected. The mean age of subjects was about 44 years. The R/G values of the ND, HD and FD were 0.73, 1.26 and 1.83 respectively. There were significant differences between all groups ($p < 0.001$), and strong positive correlation was identified between the R/G value and the accumulation of deposits ($r = 0.90$, $p < 0.001$).

Conclusion: The intensity of red fluorescence as observed in the QLF images correlated well with the accumulation maturation of the deposits, which indicates that the QLF technology can be used to evaluate the status of oral hygiene.

Key words : Bacterial dental deposits, Quantitative Light-induced fluorescence, Red fluorescence intensity.

Corresponding Author

Department of Preventive Dentistry and Public Oral Health, Yonsei University College of Dentistry, 50, Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Korea

Tel: +82-2-2228-3070, Fax: +82-2-392-2926, E-mail: drkbi@yuhs.ac

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(316071031HD020)

I. 서론

치면세균막은 구강에 존재하는 세균 군집으로 치아우식증 및 치주질환과 같은 구강질환 발생의 주요 원인이다. 따라서 구강 질환의 예방을 위해 치면세균막을 탐지하고 관리하는 것은 중요하다. 하지만 치면세균막은 치아 표면의 색상과 유사하기 때문에 복잡한 구강 구조에서 육안으로 탐지하기 어렵다. 또한, 치면세균막은 침착기간이 길어짐에 따라 병원성을 갖는 세균과 독성물질의 분비가 증가하여 치면세균막의 병원성이 증가하게 된다¹⁾. 따라서 구강보건전문가는 구강질환의 예방을 위해 치면세균막 및 치석과 같은 세균성 치아 침착물을 조기에 탐지하고 평가하여 그에 맞는 적절한 관리법을 제공할 필요가 있다.

육안으로 탐지하기 어려운 세균성 치아 침착물을 평가하기 위해 전통적으로 치면착색제를 이용해 왔으며, 이를 정량화 하기 위한 다양한 치면세균막 지수들이 활용되고 있다. 가장 널리 이용되고 있는 Quigley & Hein index (QH index)는 모든 치아를 착색하여 각 치아의 협설면에 침착된 치면세균막의 면적을 0-5점 척도로 점수화하여 평가한다²⁾. 하지만, 착색제는 획득피막이나 음식물 잔사가 함께 염색되어 치면세균막이나 치석을 명확히 구분하여 관찰하기가 어렵다는 한계점이 있다. 반면, Loe and Sillness plaque index는 착색제를 사용하지 않는 지수로서, 특정 6개의 치아의 근원협설 4개면을 평가하는데 침착물의 분포 면적이 아닌 축적된 정도를 평가한다는 것이 가장 큰 특징이다. 하지만 이 지수 또한 평가자의 주관이 개입되어 결과에 영향을 줄 수 있다는 한계점이 있다²⁾.

이러한 한계점들을 보완하여 세균성 치아 침착물을 객관적으로 탐지하고 정량화하기 위해 디지털 장비를 이용한 연구들이 수행되고 있다. Carter 등은 디지털

카메라로 촬영된 이미지에서 구강구조물과 착색된 치면세균막의 색 공간(color space)의 차이를 통해 98.7% 성공률로 자동으로 구분할 수 있음을 보고하였다³⁾. Liu등은 405 nm 파장의 광원을 이용하는 'Red fluorescence imaging system'으로 치면세균막 지수를 자동으로 산출하도록 개발하였고, QH index와 '적정' 수준의 일치도를 보고하였다⁴⁾. 또한 Quantitative light-induced fluorescence (QLF)는 405 nm 가시광선 및 특수 필터를 이용하여 치면세균막을 붉은 형광으로 탐지 가능한 기술이다^{2,5)}. 이러한 치면세균막의 형광 반응은 포피린 (porphyrin)이라는 세균성 대사산물을 붉은 형광으로 탐지하는 원리로서^{4,6,7)}, 치면세균막 뿐만 아니라 치아 경조직 내 세균이 게재된 부위를 붉은 형광으로 탐지함으로써 우식성 활성 병소를 탐지하는 것이 가능하다^{8,9)}. QLF technology 에서 탐지되는 치면세균막의 붉은 형광은 2-tone 염색제에 의해 나타나는 푸른색의 성숙된 치면세균막의 면적과 높은 일치도를 보였으며, 이는 착색제 없이 구강에서 세균성 침착물의 유무와 분포를 객관적으로 평가할 수 있음을 확인하였다^{10,11)}. 뿐만 아니라 치면세균막의 붉은 형광은 성숙 기간과 병원성이 증가함에 따라 함께 증가하기 때문에^{12,13)}, 이러한 현상을 근거로 QLF 이미지를 이용하여 세균성 침착물의 성숙 정도, 병원성 수준을 정량적으로 평가하는 것이 가능하다.

하지만 실제 구강 내 존재하는 침착물의 붉은 형광을 평가하고, 축적 정도에 따른 형광강도를 직접적으로 평가한 연구는 부족하다. 침착물의 축적 정도는 구강 질환 위험과 연관이 있으며¹⁴⁾, 그 수준을 평가하는 것은 질환 발생 위험도를 예측하고 적절한 관리법을 제공하는 것이 가능하기 때문에 임상적으로 중요하다. 따라서 본 연구의 목적은 QLF 기술을 이용하여 세균성 치아 침착물의 붉은 형광 특성을 평가하고 이를 통해 침착물의 축적 정도를 구분하고

정량적으로 평가할 수 있는지 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 후향적 단면연구로서 2016년 1월부터 12월까지 서울 역삼동 소재의 B 치과의원에 내원하여 QLF technology 기반의 임상용 촬영 장비인 Qraycam (AIOBIO, Seoul, Korea)으로 촬영한 환자를 대상으로 하였다. 이들의 전치부 순면 촬영 이미지를 이용하였고 한 환자 당 한 개의 치면을 분석 대상으로 선정하였다. 치면의 선정은 붉은 형광이 나타나는 치면을 우선 선정하였으며 2개 치면 이상 붉은 형광이 관찰될 시 무작위 추출 방법을 사용하였으며, 건전 치면만 관찰되는 경우 또한 무작위 추출 방법을 사용하였다.

2. 연구방법

1) 자료선별

QLF장비로부터 획득한 환자의 이미지를

스크리닝하여 다음의 제외기준에 따라 케이스를 선별하였다(Fig. 1). 제외기준: (1) 전치부 순면에 심한 착색이 존재하는 경우 (2) 교정치료로 인해 고정성 교정용 브라켓이 부착된 경우 (3) 자연치가 아닌 인공치로만 이루어진 경우

2) 세균성 치아 침착물의 분류

본 연구에서는 QLF로 촬영된 백색광, 형광 이미지를 이용하여 세균성 치아 침착물을 침착 정도에 따른 임상적 특성에 따라 3단계로 분류한 후 각 침착물의 형광 특성을 분석하였다. 숙련된 한 명의 검사자가 분석 대상 침착물을 선정하고, 선정된 침착물을 다른 두 명의 검사자가 본 연구에서 설정한 분류 기준(Table 1)에 따라 3단계로 분류하여 두 명의 검사자가 동일하게 분류한 침착물만을 대상으로 분석하였다. 첫 번째 검사자가 각각의 전치부 형광 이미지에서 치은연을 따라 치은연상부위에 붉은 형광이 나타나는 한 부위를 선정하여 관심부위(ROI, Region of Interest)로 지정하였다. 붉은 형광이 관찰되지 않는 경우 전치부 치면 중 무작위로 한 치아의 치은연 상방 협면 중앙 부위를 ROI로

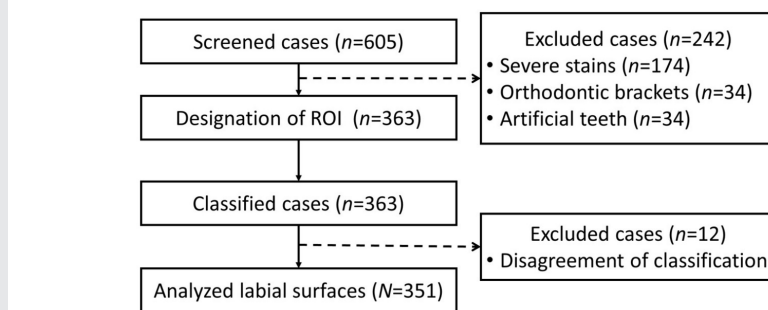


Fig. 1. Flow chart of screening and exclusion process (n = number of subjects, N = number of labial surfaces)

지정하였다. 지정된 ROI의 백색광, 형광이미지를 이용하여 독립된 두 명의 검사자가 본 연구에서 설정한 분류 기준(Table 1)에 따라 세 그룹[Not detectable deposits (ND), Half detectable deposits (HD), Full detectable deposits (FD)]으로 분류하였다. 백색광 이미지에서 육안으로 보이지 않고 형광 이미지에서도 붉은 형광이 관찰되지 않는 경우 ND로, 백색광 이미지에서 육안으로 침착물이 관찰되지 않으나 형광 이미지에서 붉은 형광이 관찰되는 경우 HD로, 백색광 이미지에서 육안으로 관찰될 정도로 축적된 침착물이 있고 동시에 형광 이미지에서 붉은 형광이 관찰되는 경우 FD로 분류하였다. 각 검사자가 해당 기준에 따라 모든 케이스를 분류한 후 두 명의 검사자가 모두 동일한 그룹으로 분류한 케이스만을 최종 분석에 사용하였다.

3) 이미지분석


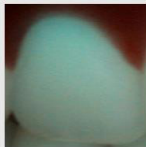

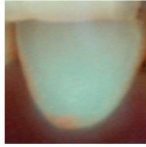

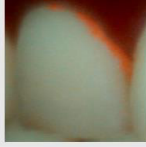
형광 이미지에서 관찰되는 침착물의 형광 강도를 정량화하기 위해 ImageJ (Ver. 1.51j8, National Institutes of Health, USA) 프로그램을 사용하였다.

각 형광 이미지에서 선정된 침착물의 ROI에 분석 패치를 지정하여 RGB 색체계에 따라 각 픽셀의 Red, Green, Blue 값을 산출하여 평균값을 계산하였다. 이후, 붉은 형광 강도를 비교하기 위해 각 침착물의 ROI로부터 산출된 Red, Green 값을 이용하여 Red/Green (R/G) 값을 계산하여 분석에 사용하였다.

4) 통계분석

침착물의 축적 정도에 따른 그룹 간 붉은 형광 강도를 비교하기 위해 Levene의 등분산 검정을 시행한 결과, 등분산 가정을 만족하지 않았으며 ($p < 0.001$) 각 군 간 표본수에 차이가 있어 Welch's ANOVA test를 수행하였다. 이후 사후분석은 등분산 가정을 만족하지 않아 Dunnett's T3 test를 통해 군 간의 차이를 확인하였다¹⁵). 침착물의 관찰 여부에 따라 분류한 그룹과 붉은 형광 강도의 상관관계를 평가하기 위해 분류 그룹과 붉은 형광 강도 수치를 서열 척도화하여 Spearman 상관 분석을 실시하였다. 또한, 여러 치아 침착물 분류에 대한 평가자 간 일치도를 평가하기 위해 일치도를 평가하는 Cohen's

Table 1. Classification criteria of bacterial dental deposits in this study

Groups	Description	WLI	FI
Not detectable deposits (ND)	WLI (X) / FI (X) : Deposits not visible with both WLI and red fluorescence with FI		
Half detectable deposits (HD)	WLI (X) / FI (O) : Deposits not visible with WLI, but red fluorescence visible with FI		
Full detectable deposits (FD)	WLI (O) / FI (O) : Accumulated deposits visible with both WLI and red fluorescence with FI		

WLI, White-light image; FI, Fluorescence image

kappa를 계산하였다. 분석프로그램은 SPSS 23.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) 통계 프로그램을 사용하였으며 유의수준은 0.05로 설정하였다.

III. 결과

총 605명의 대상자들에게서 수집된 이미지 중 제외 기준에 따라 351명의 이미지가 최종 분석에 사용되었다. 최종 분석된 대상자의 평균 연령은 43.95 (± 16.68)세였으며, 남녀 비율은 각각 147명(41.88%), 204명(58.12%) 이었다. 제시된 분류 기준(Table 1)을 통한 두 명의 평가자 간 일치도를 Cohen's kappa로 분석한 결과 0.95의 일치도를 보였다. 그룹별 분포는 ND가 183명(52.1%)으로 가장 많았으며, HD와 FD 두 그룹이 각각 84명(23.9%)으로 같은 분포를 이루었다. 그룹별 평균 붉은 형광 강도 평균을 Welch's ANOVA

test로 비교한 결과(Fig. 2), ND는 $0.73(\pm 0.10)$ 으로 가장 낮았으며, HD는 $1.26(\pm 0.22)$, FD는 $1.83(\pm 0.40)$ 으로 가장 높았다($p < 0.001$). Dunnett's T3 test를 통한 사후 검정 결과, 모든 군 간 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$). 그룹 간 차이는 HD가 ND 보다 약 1.7배, FD는 ND에 비해 약 2.5배, ID에 비해 약 1.4배 높아 붉은 형광이 가장 강하게 발현됨을 확인하였다. 상관 분석 결과, ND-HD-FD로 갈수록 붉은 형광 강도는 강한 양의 상관관계를 보이며 증가하였다($r = 0.90$, $p < 0.001$).

IV. 고찰

본 연구에서는 QLF technology 기반의 임상용 장비인 Qraycam에서 획득한 이미지를 이용하여 실제 구강 내 존재하는 세균성 침착물의 붉은 형광 특성을

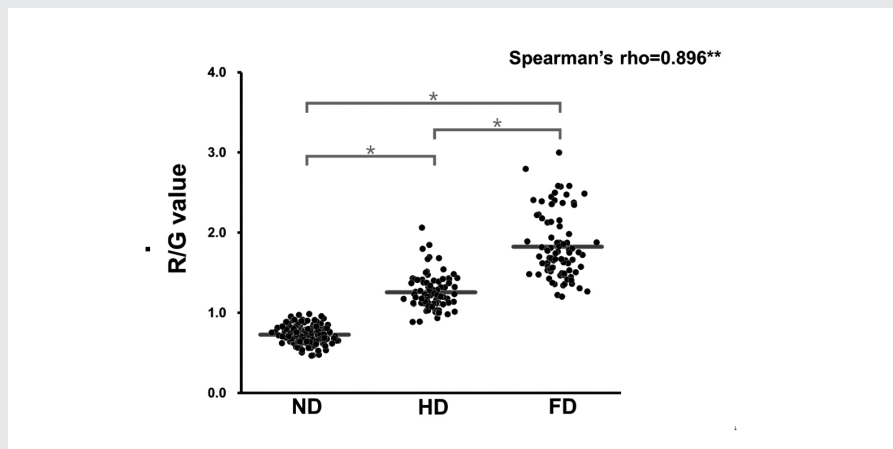


Fig. 2. Jitter plots of Red/Green (R/G) values of each deposit

The line through the middle of plots represents the mean.

ND, Not detectable deposits; HD, Half detectable deposits; FD, Full detectable deposits

*indicated statistical significances between two groups by the Welch's ANOVA test with Dunnett's T3 posthoc paired comparison test, $p < 0.001$

** $p < 0.001$

통해 침착물의 축적 정도를 평가할 수 있음을 확인하였다. 침착물의 축적 정도는 병원성 수준, 즉 질병 발생 위험도와 관련성이 있고, 예방적 측면에서 축적 정도에 따라 다른 관리법을 제공하는 것이 중요하기 때문에 본 연구의 임상적 의의가 강조된다. 기존의 평가 방법들은 단순히 존재 여부 및 분포에 초점을 두어 왔으며 주관적인 평가 기준으로 인해 평가에 어려움이 있었다. 본 연구 결과를 통해 착색제의 사용 없이 QLF technology를 이용하여 침착물의 축적 정도를 정량적인 수치(R/G)로 평가하고 구분하는 것이 가능함을 확인하였다. 형광 이미지 상에서 나타나는 침착물의 형광 강도는 침착 정도가 심화될수록 증가하는 경향을 보였으며 형광 강도와 축적 정도 간에 높은 상관관계를 확인할 수 있었다.

R/G 변수를 이용하여 그룹 간 붉은 형광 강도를 비교한 결과, 육안으로 명확히 관찰되는 즉, 오랜 기간 성숙된 침착물이 육안으로 관찰이 어려운 초기단계의 침착물보다 유의하게 더 높았다(Fig. 2). 이는 세균성 침착물의 성숙도가 높아질수록 late colonizer인 혐기성 세균의 구성이 증가하게 되고 이들 세균 간 대사 작용으로 인해 생성되는 대사산물 농도가 증가하여 붉은 형광 강도가 증가한 것으로 사료된다. 성숙된 치면세균막일수록 혐기성 세균 및 그람 음성 균은 증가하는데^{16,17)}, 붉은 형광이 나타나는 치면세균막에는 형광이 발현되지 않는 치면세균막보다 더 많은 그람 음성균 및 혐기성 세균이 존재한다^{5,13,18,19)}. 실제로 치면세균막의 붉은 형광은 박테리아의 대사산물인 endogenous porphyrin으로 부터 기원하며 3일 이상 배양된 치면세균막에서 관찰되기 시작한다¹²⁾. 그리고 붉은 형광의 강도는 치면세균막의 성숙기간과 우식병원성(cariogenicity)에 비례하여 증가함으로써 치면세균막의 병원성 수준을 평가하는 지표로 활용될 수 있다고 하였다^{13,20)}. 또한 최근

임상연구에 따르면, 치면세균막의 붉은 형광은 치은 염증과도 관련성이 있음이 보고되었다²¹⁾. 실제로 본 연구에서 각 침착물의 R/G 값과 구강 질병 발생과의 관련성을 직접 확인할 수는 없었으나 R/G 값이 상대적으로 높은 침착물은 오래 성숙되어 질병발생 위험이 높은 상태임을 예측할 수 있다. 따라서 붉은 형광이 강하게 발현되는 침착물의 경우 오랫동안 축적된 상태로 제거가 어려울 수 있으므로 우선적으로 관리하고, 전문가 관리를 요구할 것으로 사료된다. 상대적으로 높은 R/G 값은 고위험의 집중적인 전문가 관리가 필요한 상태임을 예측하는 지표로서 활용될 수 있겠다.

본 연구에서 설정한 HD는 육안으로는 탐지가 쉽지 않은 정도의 얇은 침착물이었으나 QLF의 붉은 형광으로는 관찰이 가능하였다. 붉은 형광은 3일 이상 성숙된 치면세균막에서 관찰되고 치면세균막의 우식병원성과 관련성이 있다는 선행연구 결과로 미루어 보아 육안으로는 탐지가 어려우나 붉은 형광이 발현되는 치면세균막은 3일 이상 침착되어 병원성 세균 구성이 증가한 불균형 상태임을 예측할 수 있다. 즉, 현재 상태에서 제거되지 않는 경우 병원성을 발현할 수 있는 초기 단계임을 의미하기 때문에 더욱 성숙되기 이전에 관리가 필요하다. 따라서 육안으로는 탐지가 어려우나 QLF 관찰 시 약한 붉은 형광을 발현하는 침착물이 존재하는 경우 비침습적인 전문가 치면세균막 관리를 제공할 뿐만 아니라 특히, 자가 관리의 중요성을 강조할 수 있다는 측면에서 임상적으로 유용하다.

본 연구의 결과에 따르면, FD의 R/G 값의 분포가 다른 두 군에 비해 넓게 분포하여 표준편차가 높음을 확인하였다(Fig. 2). 이는 FD 그룹에 실제 포함된 침착물의 침착 정도가 다른 군에 비해 다양하며 이에 따라 붉은 형광의 발현 정도가 다양함을 의미한다. 특히 해당 군에는 오래 침착된 성숙한 치면세균막

뿐만 아니라 치석까지도 포함된 것으로 사료된다. 치석은 일련의 치면세균막 형성 과정의 최종 산물로서 형성된 단단한 구조물로 그 표면은 치면세균막과 함께 존재한다²²⁾. 또한 자외선 광원(405 nm)을 조사하였을 때 붉은 주황색의 형광을 나타내며²³⁾, 398과 405 nm 파장에서 강한 형광을 발현한다²⁴⁾. 실제로 본 연구에서 QLF로 촬영된 FD그룹의 형광 이미지 중 치석으로 명확히 관찰되는 침착물을 선정하여 추가 분석한 결과, R/G 수치가 $1.93(\pm 0.38)$ 으로 치석의 경우를 제외한 FD 그룹의 수치에 비해 다소 강한 수준의 형광을 발현하였다. 또한 이미지상에서 치면세균막과는 다른 주황색의 형광을 보이는 경우도 관찰되었다. 이는 치면세균막과 치석의 물리화학적 특성에 따른 형광 발현 원리의 차이에서 기인한 것으로 보이거나 아직 이에 대한 연구는 부족하다. 따라서 치면세균막과 치석을 명확히 구분하여 이들의 형광 차이를 비교하고 이들 두 구조물의 형광 발현 원리를 규명하기 위한 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 치면세균막과 치석을 제거하고 관리하기 위해서는 각각 다른 전문가 술식이 적용될 수 있다. 따라서 QLF 기술을 활용하여 대상자의 구강 내

존재하는 침착물의 종류와 특성에 따라 어떠한 예방 관리 술식을 제공할 것인지에 대한 의사 결정 과정에 근거를 제공하는 것이 가능할 것이다.

본 연구는 후향적 단면연구로서 침착물의 성숙기간에 대한 정보와 임상 증상에 대한 평가를 수행하기에는 한계가 있었다. 또한 촬영된 이미지만을 활용한 연구이기 때문에 세균성 치아 침착물을 임상적으로 명확히 구분할 수 없었다. 따라서 향후에는 전향적 연구를 통해 명확히 구분되는 각 침착물의 형광특성을 비교하고 그 결과에 따른 적절한 관리법을 제공하기 위한 근거를 마련하기 위한 연구가 필요하다. 그러나 본 연구에서 실제 구강 내 존재하는 침착물을 대상으로 분석했다는 점과 2인의 검사자를 통해 명확히 구분되는 침착물을 대상으로 선정함으로써 이러한 한계점을 보완하여 평가하는 것이 가능하였다. 이러한 연구 방법을 통한 결과에 따르면, 세균성 치아 침착물의 붉은 형광 특성을 이용하여 침착물의 축적 정도를 구분하고 구강 위생 상태를 평가하여 그 결과에 따라 적절한 예방적 구강관리법을 적용할 수 있는 근거를 제공하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006;6 Suppl 1:S14
2. Pretty IA, Edgar WM, Smith PW, Higham SM. Quantification of dental plaque in the research environment. *J Dent* 2005;33(3):193–207
3. Carter K, Landini G, Walmsley AD. Automated quantification of dental plaque accumulation using digital imaging. *J Dent* 2004;32(8):623–628
4. Liu Z, Gomez J, Khan S, et al. Red fluorescence imaging for dental plaque detection and quantification: pilot study. *J Biomed Opt* 2017;22(9):1–10
5. Coulthwaite L, Pretty IA, Smith PW, et al. The microbiological origin of fluorescence observed in plaque on dentures during QLF analysis. *Caries Res* 2006;40(2):112–116
6. K. HC, E. dJdJ, T. FMR, et al. Photobleaching of red fluorescence in oral biofilms. *Journal of Periodontal Research* 2011;46(2):228–234
7. König K, Flemming G, Hibst R. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cellular and Molecular Biology* 1998;44(8):1293–1300
8. Lee H-S, Kim S-K, Park S-W, et al. Caries detection and quantification around stained pits and fissures in occlusal tooth surfaces with fluorescence. *Journal of biomedical optics* 2018;23(9):091402
9. Kim H-E, Kim B-I. Analysis of orange/red fluorescence for bacterial activity in initial carious lesions may provide accurate lesion activity assessment for caries progression. *Journal of Evidence Based Dental Practice* 2017;17(2):125–128
10. Han SY, Kim BR, Ko HY, et al. Assessing the use of Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital as a clinical plaque assessment. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;13:34–39
11. Khudanov B, Jung HI, Kahharova D, et al. Effect of an oral health education program based on the use of quantitative light-induced fluorescence technology in Uzbekistan adolescents. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 2018;21:379–384
12. Kim YS, Lee ES, Kwon HK, Kim BI. Monitoring the maturation process of a dental microcosm biofilm using the Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). *J Dent* 2014;42(6):691–696
13. Lee ES, Kang SM, Ko HY, et al. Association between the cariogenicity of a dental microcosm biofilm and its red fluorescence detected by Quantitative Light-induced Fluorescence-Digital (QLF-D). *J Dent* 2013;41(12):1264–1270
14. Alaluusua S, Malmivirta R. EARLY PLAQUE ACCUMULATION – A SIGN FOR CARIES RISK IN YOUNG-CHILDREN. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1994;22(5):273–276
15. Harada K, Raigrodski AJ, Chung K-H, et al. A comparative evaluation of the translucency of zirconias and lithium disilicate for monolithic restorations. *The Journal of prosthetic dentistry* 2016;116(2):257–263
16. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995;15(3):169–175
17. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research* 2013;69(1):137–143
18. van der Veen MH, Thomas RZ, Huysmans MC, de Soet JJ. Red autofluorescence of dental plaque bacteria. *Caries Res* 2006;40(6):542–545
19. Volgenant CMC, Zaura E, Brandt BW, et al. Red fluorescence of dental plaque in children – A cross-sectional study. *Journal of Dentistry* 2017;58:40–47
20. Lee E-S, De Jong EDJ, Jung H-I, Kim B-I. Red fluorescence of dental biofilm as an indicator for assessing the efficacy of antimicrobials. *Journal of biomedical optics* 2018;23(1):015003
21. van der Veen MH, Volgenant CMC, Keijsers B, et al. Dynamics of red fluorescent dental plaque during experimental gingivitis – A cohort study. *Journal of Dentistry* 2016;48:71–76
22. Akcalı A, Lang NP. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontology 2000* 2018;76(1):109–115
23. Lee Y-K. Fluorescence properties of human teeth and dental calculus for clinical applications. *Journal of Biomedical Optics* 2015;20(4):040901
24. Buchalla W, Lennon AM, Attin T. Fluorescence spectroscopy of dental calculus. *J Periodontal Res* 2004;39(5):327–332