

LEDA RODRIGUES DE ASSIS

Estudos serológicos com STREPTOCOCCUS de placa dentária
com ênfase na identificação e caracterização
desses microrganismos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do grau de Mestre
em Biologia e Patologia Buco-Dental (Micro-
biologia e Imunologia.)

PIRACICABA - SP

1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais,

meus grandes incentivadores, cujos ensinamentos,
estímulo e orientação segura, foram fundamentais
para a conquista de um ideal;

Aos meus irmãos,

com carinho.

Ao Doutor JOSÉ FRANCISCO HÖFLING, Professor Livre-Docente do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, com o qual tivemos a oportunidade de iniciar nossas atividades científicas e cujos ensinamentos, estímulos e presença constantes foram de importância fundamental para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos aqueles que direta ou indiretamente participaram na elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS NEDER, Coordenador Geral das Faculdades da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio e incentivo à pesquisa nesta Faculdade;

À Direção desta Casa de Ensino, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHT e seu associado Prof. Dr. SIMONIDES CONSANI;

Ao Prof. Dr. JAN CARLSSON, Prof. da Faculdade de Odontologia da Universidade de Umea, Suécia, pelo fornecimento do material;

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, desta Escola, pelo espírito de serviço e solidariedade com que nos distinguiu durante o transcorrer do curso de pós-graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Processo 10.0162/80 - BQ.;

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY, Professor do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela amizade e colaboração no decorrer do Curso;

Ao Prof. Dr. PEDRO BERTOLINI, Professor do Departamento de Diagnóstico Oral, pela atenção que nos dedicou, facultando - nos o uso dos laboratōrios;

Ao Prof. JOSÉ CARLOS SILVA, pelo apoio e incentivo constantes;

À arquiteta MARIA ELENA P. NARDIN e ao estudante de engenharia JOSÉ CARLOS R. DE ASSIS, pelo traçado dos grāficos;

À MARIA APARECIDA NALIN, MARIA DE FATIMA F.S. DANTAS e SUELI D. DE OLIVEIRA SOLIANI, pelos serviços prestados;

Demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em particular a Sra. Benedita Terezinha Moreira, Reinaldo José Casagrande e Carlos Alberto Aparecido Feliciano;

Aos meus colegas da pós-graduação, pela amizade e apoio, cuja convivência foi enriquecedora.

S U M Á R I O

	pág.
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	66
RESUMO	69
SUMMARY	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

INDICE DOS QUADROS

QUADRO	pág.
1	Relação das espécies de estreptococos utilizadas nos experimentos 27
2	Esquema de imunização dos antissoros obtidos pela injeção no linfonôdulo e intramuscular de coelho, com suspensões bacterianas de <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> e <i>S. faecalis</i> 31
3	Título máximo dos antissoros obtidos nas imunizações 37
4	<i>S. sanguis</i> contra AS Ss ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 42
5	<i>S. salivarius</i> contra AS S sal ATCC 169. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 43
6	<i>S. mitis</i> contra AS S mit OV 170. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 44
7	<i>S. mutans</i> contra AS S mut IBR 171. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 45

QUADRO	pág.
8	<i>S. faecalis</i> contra AS S f NCTC 172. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% - com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 46
9	Antissoro AS Ss ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). 47
10	Antissoro AS S sal ATCC 169. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 48
11	Antissoro AS S mit OV 170. Testes serológicos - de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 49
12	Antissoro AS S mut IBR 171. Testes serológicos - de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 50
13	Antissoro AS S f NCTC 172. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) 51

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		pág.
1	Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL. (AS): AS Ss ATCC 167. (Ag): Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> ; (2) <i>S. salivarius</i> ; (4) <i>S. mitis</i> ; (5) <i>S. faecalis</i>	52
2	Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas segundo RANTZ & RANDALL(R-R). (AS): AS S sal ATCC. (Ag): Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> ; (2) <i>S. salivarius</i> ; (3) <i>S. mutans</i> ; (4) <i>S. mitis</i> ; (5) <i>S. faecalis</i>	53
3	Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS S mit OV 170. (Ag): Antígeno: (4) <i>S. mitis</i>	54
4	Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL(R-R). (AS) : AS S mut IBR 171. (Ag): Antígenos: (2) <i>S. salivarius</i> ; (3) <i>S. mutans</i> ; (5) <i>S. faecalis</i>	55
5	Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS S f NCTC 172. (Ag): Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> ; (3) <i>S. mutans</i> ; (5) <i>S. faecalis</i>	56

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA	pág.
1 Preparo de antígenos bacterianos para imuniza ção	30
2 Preparo de extratos bacterianos para serem u- sados nas reações serológicas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R)	34

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A questão fundamental de estudos atuais tem sido determinar até que ponto técnicas serológicas possam ser utilizadas em estudos de microrganismos orais. Estudos realizados através de reações de aglutinação (GRUBER & DURHAM, 1896) demonstraram que a célula bacteriana continha muitas estruturas que podiam atuar como antígenos. Mais precisamente, o problema consistia em se determinar no "mosaico" de antígeno, um ou mais antígenos que podiam ser demonstrados em cepas classificadas como por exemplo *S. mutans*, mas não em outras bactérias. Posteriormente, estudos levados a efeito por ZINNER et al, 1965a; JABLON & ZINNER, 1966; GIBBONS et al, 1966 demonstraram que antissoros contra cepas de *S. mutans* são capazes de reação cruzada com cepas heterólogas em estudos de imunodifusão.

Nos últimos anos tem-se observado a publicação de pesquisas que ampliaram o conhecimento sobre a classificação, ecologia e significado biológico de estreptococos de placa dentária. Para se determinar a presença desses componentes

associados ao desenvolvimento da cárie dentária, particularmente a classificação, identificação e caracterização desses microrganismos, métodos serológicos tem sido de grande valia (BRATHALL, 1970, 1972; COYKENDALL, 1974).

Desde que as bactérias estão envolvidas no aparecimento da cárie, parece claro que seu início e evolução devem ser determinados por uma interrelação parasito-hospedeiro. Dessa forma, o conhecimento dos principais fatores relacionados ao binômio parasita-hospedeiro devem ser preliminarmente determinados antes de se iniciar experimentações de natureza clínica.

Estudos preliminares levados a efeito por HÖFLING (1981), através da análise de antissoros obtidos contra *Streptococcus sanguis* em reação com antígenos de suspensões bacterianas em água, salina, segundo Rantz & Randall, em ácido acético e segundo Lancefield, das espécies *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. mitis* e *S. salivarius*, demonstraram que os extratos obtidos segundo Rantz & Randall parecem ser mais adequados, quando comparados com os demais antígenos obtidos.

Neste trabalho nós procuramos analisar as principais espécies de estreptococos de placa dentária sob o ponto de vista serológico com o objetivo de contribuir para os estudos de identificação, caracterização e classificação de microrganismos orais, particularmente associados ao mecanismo de cárie dentária.

A análise de antissoros obtidos contra os microrganismos *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. mitis* e *S. salivarius*, em reação com os antígenos bacterianos obtidos dessas espécies, foi efetuada através de reações serológicas, com ênfase, a um estudo das relações de afinidade serológica entre essas espécies.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

A composição microbiana da placa dentária tem sido amplamente estudada por ser considerada o principal fator etiológico nas duas maiores doenças, a cárie dentária e a doença periodontal (HARDIE & BOWDEN, 1975; THEILADE & THEILADE, 1976). Os estreptococos tem chamado a atenção dos pesquisadores como um patógeno específico na cárie dentária. Os *Streptococcus mutans* mostraram-se indutores de cárie em animais e há também bastante evidências dessa espécie estar associada a cárie dentária em humanos, o que se pode observar na exaustiva literatura a respeito. Outras espécies de estreptococos presentes na boca tem recebido menor atenção nos recentes anos, embora, muitas dessas espécies tem sido vistas presentes em sérias infecções sistêmicas como a endocardite.

A maioria dos estreptococos isolados da boca pertencem aos tipos viridescents (viridans) e não hemolíticos (indiferentes) baseados na placa de agar-sangue e podem ser considerados como encontrados entre o grupo "viridans" (SHERMAN, 1937). Segundo COLMAN (1976), entretanto, o fenôme-

no de hemólise parece não ser uma propriedade particular desses microrganismos que possa ser utilizada com segurança, já que todos os tipos de hemólise (α , β e γ) ocorre em isolados orais.

A classificação dos estreptococos viridantes tem sido tradicionalmente difícil, mas nos recentes anos foi bastante incrementada, graças aos estudos de COLMAN & WILLIAMS (1972); CARLSSON (1968); COLMAN (1976); HARDIE & BOWDEN (1976a) e outros.

As espécies de estreptococos mais comumente encontradas na cavidade oral são *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. milleri* e *S. salivarius*. Essa nomenclatura parece não ser utilizada por todos os pesquisadores, dessa forma, algumas classificações alternativas são propostas (Tabela 1). Outras espécies podem ser isoladas em alguns casos, mas observadas em números muito pequenos. Enterococos como *S. faecalis*, *S. faecium* e *S. durans* podem ser encontrados e sua distribuição na boca tem sido mencionada (GOLD et al., 1975). *Streptococcus bovis* não tem sido isolado com certeza da cavidade oral humana embora ele tem sido isolado da placa dentária de alguns animais herbívoros. As espécies mencionadas na Tabela 1 dizem respeito a maioria dos estreptococos isolados da cavidade oral, embora outros "strains" são encontrados os quais não se enquadram entre as taxas existentes.

Alguns dos estreptococos orais, especialmente certos "strains" de *S. mutans* requerem dióxido de carbono para o crescimento em meio sólido. Relativamente poucas informações são disponíveis acerca da prevalência, distribuição e propriedades de espécies anaeróbicas na cavidade oral. Cocos Gram positivos anaeróbicos tem sido mencionados em estudos de cultura

TABELA 1

NOMENCLATURA DOS ESTREPTOCOCOS COMUMENTE ENCONTRADOS NA BÔCA

COLMAN & WILLIAMS (1972)	CARLSSON (1968)	FACKLAM (1977)	PARKER & BALL (1976)
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> (Grupo II)	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i> (Grupo I:B)	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i>
<i>S. mitior</i>	<i>S. sanguis</i> (Grupo I:A)	<i>S. sanguis</i> II	<i>S. mitior</i> Dx + mitior
	<i>S. mitis</i> (Grupo IV,V)	<i>S. mitis</i>	"viridans"
<i>S. milleri</i>	?	<i>S.MG-intermedius</i> <i>S.anginocus</i> <i>constrellotres</i>	<i>S. milleri</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> (Grupo III)	<i>S. salivarius</i>	<i>S.salivarius</i>

Dx + mitior: *S. mitior* dextrana positivo

de placa dentária (SOCRANSKY et al, 1977) e também tem sido isolado de lesões cariosas profundas da dentina (EDWARDSSON, 1974), infectando a câmara pulpal e as raízes do canal (BERG & NORD, 1973; KANTZ & HENRY, 1974; WITIGOW & SABISTON, 1975; SUNDQUIST, 1976) e abscessos dentários (SABISTON & GOLD, 1974). Parece necessário que técnicas de isolamento de anaeróbios mais elaborados são indispensáveis para o reconhecimento de estreptococos anaeróbicos de material oral. Estudos realizados por HARDIE & MARSH (1978) em placa supragengival, utilizando-se o sistema anaeróbico convencional (Jarra anaeróbica) demonstraram grande dificuldade no isolamento de estreptococos anaeróbicos. Isso sugere a necessidade de maiores estudos nessa área.

Streptococcus mutans

Esta espécie é geralmente reconhecida como a espécie mais bem definida, com uma série de características distintas (CLARKE, 1924; EDWARDSON, 1968; FACKLAM, 1974; PERCH et al, 1974; HARDIE & BOWDEN, 1976a). As cepas de *S. mutans* fermentam manitol e sorbitol, produzindo glucanos extracelulares (dextrana) a partir da sacarose, hidrolizam esculina, mas não arginina (com exceção do serotipo b) ou amido, produzem também acetofina de glicose, não produzindo usualmente peróxido de hidrogênio, tolerando 6,5% cloreto de sódio, e crescendo a 45°C. Estudos taxonômicos com estreptococos orais tem demonstrado aglomerados distintos de variedades correspondendo a *S. mutans* (CARLSSON, 1968; COLMAN, 1968; DRUCKER & MERVILLE, 1971).

Vários serotipos de *S. mutans* já foram descritos (BRATTHAL, 1970; PERCH et al, 1974) os quais tem sido correlacionados com a composição de carboidratos na parede celular (HARDIE & BOWDEN, 1974b). Estudos levados a efeito com o

conteúdo básico do DNA e híbridos de DNA entre as diversas cepas de *S. mutans* associados com dados bioquímicos e serológicos, sugeriram a proposição de sub espécies (COYKENDALL, 1974). Mais recentemente COYKENDALL (1977) sugeriu que as sub espécies propostas fossem consideradas espécies, denominadas *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricettus*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. Não está claro, até o momento, como estas espécies poderão ter um sentido prático. Parece ter mais sentido se todos os laboratórios e livros de referência reconhecessem as diversas cepas de *S. mutans* (coletivamente) antes de introduzir cinco diferentes nomes para as diversas variedades genéticas. Algumas características bioquímicas se correlacionam muito bem com as diferentes subdivisões de *S. mutans*, tal como a produção de amônia da arginina pelo serotipo b (*S. rattus*) e tais observações levaram ao desenvolvimento de um esquema bioquímico para o reconhecimento dos diferentes serotipos (SHKLAIR & KEENE, 1974). Esse esquema foi originalmente formulado com base nas reações de um pequeno número de variedades de referência, o que torna-se difícil ampliar tais fatos para as demais cepas de estreptococos.

Essas subdivisões de *S. mutans* podem ser úteis em estudos epidemiológicos em populações humanas e a divisão por produção de bacteriocinas ou substâncias tipo bacteriocinas tem sido descritas por muitos pesquisadores.

Streptococcus sanguis

Essa espécie foi originalmente isolada do sangue de pacientes com endocardite bacteriana mas atualmente é reconhecida como uma das espécies mais numerosas da cavidade oral (CARLSSON, 1965, 1967). Observações anteriores da literatura demonstrando uma relação do *S. sanguis* com o grupo H de Lan

cefield têm sido discutidos por vários autores (COLMAN & WILLIAMS, 1972; COLMAN, 1976; HARDIE & BOWDEN, 1976a).

O aparecimento do *S. sanguis* na cavidade oral humana se dá após 6 meses de nascimento, o que corresponde com o aparecimento dos primeiros dentes (CARLSSON et al, 1970b). Assim, essa espécie constitui uma proporção significativa dos estreptococos de placa dentária e parece ser um dos primeiros colonizadores da superfície dos dentes limpos (TINANOFF et al, 1976; SOCRANSKY et al, 1977). Por comparação, somente pequeno número de *S. sanguis* tem sido encontrado em material fecal humano (VAN HOUTE et al, 1971), assim, tudo indica que a cavidade oral é o lugar preferido desse microrganismo quando ele está presente em casos de endocardite. Cepas de *S. sanguis* também já foram isolados de solo (GLEDHILL & CASIDA, 1969).

Variedades de *S. sanguis* hidrolizam arginina e esculina, produzem H₂S e formam glucano extracelular (dextrana) quando crescem em presença de sacarose.

Estudos serológicos dessa espécie, indicaram que há serotipos diferentes designados I, II e I/II (WASHBURN et al, 1946) representado pelas variedades NCTC 7863 (ATCC 19556), NCTC 7864 (ATCC 10557) e NCTC 7865 (ATCC 10558). Variedades lembrando a NCTC 7864 (tipo II) formam grupos separados do tipo I nos estudos taxonômicos feitos por COLMAN (1968) e CARLSSON (1968), e essa evidência, associada com a parede celular e diferenças serológicas e genéticas, fornecem um forte argumento para a separação dessa espécie (*S. mitior*). Nos recentes relatos de PARKER & BALL (1976) os nomes de *S. sanguis* e *S. mitior* são usados para descrever esses dois grupos de organismos, enquanto FACKLAM (1977) e os laboratórios de referências, preferem manter os termos de *S. sanguis*, biotipos I e II.

Muitos autores, encontraram ocasionalmente variedades "intermediárias" que não se posicionam claramente dentro dessas duas espécies ou biotipos. Estudos levados a efeito por PARKER & BALL (1976), demonstraram que 37% das cepas de *S. sanguis* reagem com o antissoro do grupo H de Lancefield.

Streptococcus mitior

O nome de *S. mitior* originou-se de SCHOTTMULLER (1903) e como mencionado anteriormente, proposto por COLMAN & WILLIAMS (1972) para o grupo de cepas as quais formam um aglomerado homogêneo em estudos taxonômicos numéricos de COLMAN (1968). Essas cepas demonstraram serem geneticamente relacionadas em testes de transformação (COLMAN, 1969). Elas possuem uma constituição de açúcar da parede celular distinta, da qual ramnose está ausente, mas o ácido teicônico ribitol presente (COLMAN & WILLIAMS, 1965). As cepas dessas espécies produzem H₂S, não hidrolizam arginina ou esculina e dão reações variadas nos testes de Voges-Proskauer. Algumas cepas produzem glucano extracelular e frequentemente produzem colônias agar sacarose, os quais são indistinguíveis dos demais estreptococos.

Se ambas as cepas (dextrana positiva e negativa) são aceitas entre a definição de *S. mitior*, essas espécies correspondem às cepas designadas I:A (*S. sanguis*) e V:A nos estudos de CARLSSON (1968). Os termos *S. mitior* e *mitior* dextrana positivo tem sido utilizado por PARKER & BALL (1976), mas outros pesquisadores preferem nomes alternativos para descrever cepas semelhantes. Segundo o esquema usado por FACKLAM (1977), *S. sanguis* II se refere às cepas que fermentam rafnose, sendo as rafnoses negativas designadas como *S. mitis*. A formação de

dextrana é considerada uma característica variável em ambas as espécies.

O *Streptococcus mitior* é amplamente distribuído na cavidade oral humana e de animais, sendo comumente isolado do sangue em bacteremia dentária e de casos de endocardite bacteriana. Essas espécies provavelmente correspondem a muitas daquelas espécies isoladas e descritas na literatura como *S. viridans* ou *S. mitis*. Tais fatos demonstram a necessidade de estudos taxonômicos e serológicos mais acurados com cepas consideradas *S. mitior*, no sentido de que se possa definir se tal espécie deve ser reconhecida como uma espécie individual um tanto quanto heterogênea, ou subdividi-la em duas ou mais espécies.

Streptococcus salivarius

Cepas de *S. salivarius* (SHERMAN et al, 1943), normalmente produzem levano extracelular quando cultivadas em sacarose (NIVEN et al, 1941a,b). Esta propriedade resulta na produção de amplas características, tais como colônias mucóides em agar sacarose. Parece não haver discrepância entre os diferentes pesquisadores com relação às propriedades fisiológicas e a nomenclatura dessa espécie já que os estudos taxonômicos tem confirmado sua homogeneidade (COLMAN, 1968; CARLSSON, 1968).

Apesar das características fisiológicas do *S. salivarius* serem bem descritas (COWAN, 1974), certa dificuldade na sua identificação tem sido verificada, quando a característica de colônias mucóides não são observadas no crescimento em agar sacarose. A habilidade de algumas cepas em hidrolizar uréia (COLMAN, 1976) tem demonstrado ser uma importante prova

adicional.

Streptococcus milleri

Essa espécie, primeiramente descrita por GUTHOF (1956), é um exemplo de diferentes opiniões com relação a correta terminologia. O nome *S. milleri* tem sido usado por muitos pesquisadores recentemente, onde descrições mais detalhadas de suas características têm sido publicadas (COLMAN & WILLIAMS, 1972; MEJARE & EDWARDSSON, 1975; HARDIE & BOWDEN, 1976a; PARKER & BALL, 1976). As espécies descritas por esses autores incluem cepas designadas anteriormente como *Streptococcus MG* (MIRICK et al, 1944). Pequenas formações coloniais de estreptococos hemolíticos pertencentes ao grupo F ou G de Lancefield estão também incluídas nessa classificação. FACKLAM (1977) relatou as propriedades de cepas semelhantes a *S. milleri* mas prefere dividi-las em *S. MG - intermedius* (lactose+) e *S. anginosus-constellatus* (lactose-).

Cepas de *S. milleri* usualmente hidrolizam arginina e esculina e produzem acetoina a partir da glicose. Elas não produzem polissacarídeos extracelulares da sacarose, fermentam manitol ou sorbitol e produzem H₂S. Os *Streptococcus milleri* isolados são normalmente resistentes a sulfonamidas e podem crescer em meios seletivos designados por CARLSSON (1967) para o isolamento de *S. mutans* (MEJARE & EDWARDSSON, 1975).

Como mencionou COLMAN (1976), o *S. milleri* é uma espécie razoavelmente homogênea do ponto de vista de suas propriedades morfológicas, mas se mostra bastante heterogênea serologicamente.

Comparativamente, poucos estudos taxonômicos tem sido realizados sobre estreptococos viridantes e não hemolíti-

cos (COLMAN, 1968; CARLSSON, 1968; DRUCKER & MELVILLE, 1971). Esses estudos permitiram classificar os estreptococos orais em diversas taxas, como podemos verificar na Tabela 1, mas não resolve os problemas de nomenclatura relacionados com as cepas de *S. mitior* e *S. milleri*. Estudos efetuados com um grande número de estreptococos orais, incluindo testes fisiológicos, análise da parede celular e serologia, continuam sendo efetuados (HARDIE & MARSH, 1978), com a esperança de que tais estudos venham elucidar a classificação de variedades "intermediárias" que não se encaixam nas presentes espécies reconhecidas.

Métodos quemotaxonômicos não tem sido usados frequentemente em estudos sobre estreptococos orais. COLMAN & WILLIAMS (1965) demonstraram que ocorre uma variedade de padrões de carboidrato da parede celular entre os estreptococos, sendo que, alguns fatos, como por exemplo a ausência de ramnose em *S. mitior* possa ser correlacionada com determinadas espécies em particular. Nas cepas de *S. mutans*, foi observado que diferenças na composição de carboidratos da parede celular estão relacionadas com o serotipo (HARDIE & BOWDEN, 1974b). A presença de ácidos graxos em *S. mutans* tem sido examinados por DRUCKER e outros, demonstrando que a presença de tais ácidos estão vinculados às condições culturais, tais como temperatura, idade da cultura, substrato, diluição (em cultura contínua), aeração, pH e concentração de micronutrientes (DRUCKER et al, 1976; DRUCKER & VEAZEY, 1977). A caracterização de extratos de células totais em cromatografia, tem sido tentada como um possível método de identificação de estreptococos orais, mas os resultados são ainda bastante limitados, não resultando em um esquema que possa ser usado amplamente (STACK et al, 1973). Outras técnicas, tais como eletroforese e isoeletrofocos de células totais

lisadas, podem ser de valor complementar na classificação de estreptococos. Tais técnicas permitem uma análise dos padrões proteicos, que quando utilizadas em cepas representativas de *S. mutans*, demonstram que existem subdivisões entre essas espécies (RUSSEL, 1976).

A análise da composição de lípidos nos estreptococos poderá ser de valor complementar em futuros estudos taxonômicos. Esse tipo de análise tem demonstrado ser extremamente valiosa na classificação de corinebactérias (GOODFELLOW et al, 1976; MINNIKIN et al, 1977).

Métodos apropriados para o isolamento e identificação a serem usados na coleta de amostras da boca, dependem muito do lugar ou "habitat" sob investigação (HARDIE & BOWDEN, 1974a, 1976b). A escolha de um método para a inoculação de amostras nas placas em estudos quantitativos, torna-se um problema, já que há o perigo de destruição de certas bactérias, mas a maioria dos estreptococos sobrevivem aos métodos comumente utilizados, incluindo sonificação, e são geralmente sensíveis à exposição pelo oxigênio. Para estreptococos estritamente anaeróbicos, entretanto, precauções devem ser tomadas para impedir as amostras de serem expostas ao oxigênio atmosférico durante o processo.

Estreptococos orais podem ser isolados em meios não seletivos, como agar-sangue, mas a seleção de colônias de estreptococos quando na presença de outros microrganismos, torna-se difícil. O mesmo acontece, quando na distinção de estreptococos de várias espécies, apenas pela observação das colônias nesse meio. Vários meios seletivos foram desenvolvidos para o isolamento de estreptococos da cavidade oral e garganta.

Desde que alguns estreptococos produzem polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, os meios em geral incluem concentrações adequadas de sacarose. Em tais meios, cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior* e *S. salivarius* apresentam formas coloniais características, e tais fatos tem sido utilizados como base em investigações epidemiológicas. Entretanto, estudos da morfologia colonial devem ser acompanhados de outros estudos.

Os estreptococos normalmente presentes na cavidade oral, podem geralmente serem identificados a nível de espécie através de testes bioquímicos e fisiológicos convencionais (COWAN, 1974). HARDIE & BOWDEN (1976a) desenvolveram um pequeno número de sete testes, na investigação rotineira de isolados recentes. As reações usuais normalmente utilizadas em testes fisiológicos para as espécies de estreptococos podem ser observadas na Tabela 2, sendo que os dados obtidos e utilizados para essa tabela derivaram de observações feitas por HARDIE & MARSH (1978) associados a inúmeras outras publicações (CARLSSON, 1967, 1968; COLMAN & WILLIAMS, 1972; MEJARE & EDWARDS, 1975; PARKER & BALL, 1976; FACKLAM, 1977).

Os primeiros sete testes mencionados na Tabela 2 dizem respeito a aqueles testes já mencionados anteriormente, como identificação de rotina. Esse esquema tem sido utilizado para o exame de 2.808 isolados de estreptococos de placa dentária durante o curso de estudos epidemiológicos em escolares de 12-14 anos (BOWDEN et al, 1975, 1976; HARDIE et al, 1977). Cerca de 85% das cepas examinadas, puderam ser identificadas como pelo menos uma das cinco espécies mencionadas nesse sistema. Cepas dextrana positiva e negativa de *S. mitior* não puderam ser distinguidas. Ocasionalmente a presença de enterococos (Lancefield-Grupo D) puderam ser detectados.

Pequenas variações das reações mencionadas na Tabela 2 foram observadas entre os estreptococos isolados em repetidas ocasiões. Esses incluem cepas que assemelham-se a *S. sanguis*, os quais fermentam sorbitol e cepas de *S. mutans* manitol negativa. Entre *S. mutans* é conhecido que alguns serotipos dão reações bioquímicas diferentes (SHKLAIR & KEENE, 1974; PERCH et al, 1974). Segundo HARDIE & MARSH (1978), não foi isolado exemplares de *S. mutans* - serotipo b arginina positivo.

Apesar do *S. mutans* possuírem características que o distinguem dos demais estreptococos comumente isolados da cavidade oral humana, ele pode ser confundido com outros tipos de estreptococos como *S. bovis*, *S. faecalis* e *S. uberis*.

A serologia é uma técnica que foi introduzida nos laboratórios de pesquisa para auxiliar o trabalho do patologista. Fazendo-se uma leitura dos trabalhos publicados no início desse século, verifica-se que o desenvolvimento de tal técnica parece ter-se originado da necessidade de se ter uma ferramenta auxiliar no trabalho de identificação e caracterização de agentes patogênicos (DIERNHOFER, 1930; MINETT, 1931; SEELEMANN, 1930), que do ponto de vista prático tem a função de identificar tais agentes coordenando em grupos as variadas e complexas formas microbianas observadas na flora oral humana (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971; SOLOWAY, 1972) classificando essas formas de maneira a permitir o reconhecimento de suas múltiplas relações de afinidade.

A idéia de desenvolver e aplicar tais técnicas serológicas com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização de microrganismos orais, particularmente estreptococos hemolíticos, parece ter-se concretizado com os trabalhos levados a efeito por LANCEFIELD (1925, 1933), cujos resultados

TABELA 2

Algumas reações fisiológicas de estreptococos encontrados na boca.

Testes	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>S.mitior</i>	<i>S.milleri</i>	<i>S.salivarius</i>
Fermentação de					
manitol	+	-	-	-	-
sorbitol	+	-	-	-	-
Hidrólise de					
arginina	-	+	-	+	-
esculina	+	+	-	+	+
Produção de					
acetoína	+	-	V	+	V
H ₂ O ₂	-	+	+	-	-
polissacarídeo	+	+	V	-	+
Fermentação de					
ramnose	+	V	V ⁺	-	+
inulina	+	+	-	-	+
lactose	+	+	+	+++	+
trealose	+	-/V*	V	+	+/V*
melibiose	+/V*	V	V	-	-
salicin	+	+	V	+	+
Crescimento em					
6,5% NaCl	-	-	-	-	-
10% bile	V*	V*	-*	V*	V*
40% bile	V*	V*	-	-V*	-/V*

+ 85-100% positivo; - 0-15% positivo; V 16-84% positivo.

* Variações relatadas por diferentes autores.

+ FACKLAM (1977) divide as cepas em *S. sanguis* II e *S. mitior* com base na ramnose.

++ FACKLAM (1977) divide as cepas em *S. MG intermedius* e *S. anginosus-constellatus* com base na lactose.

demonstraram ser um sistema útil para a identificação de estreptococos hemolíticos patogênicos no homem e animais, baseados na presença de antígenos específicos desses estreptococos. A técnica desse autor, a qual divide as bactérias em 17 grupos (A, H, K e S), tem sido visto como, sem dúvida nenhuma, ser um excelente e realizável método de identificação de que se dispõe (COLMAN & WILLIAMS, 1967). Para o grupo viridans do qual muitos dos estreptococos orais pertencem, não foi detectado ainda um sistema equivalente. Tal aspecto, parece estar relacionado com o fato de que tais microrganismos, quando injetados em animais experimentais não são capazes de induzir a formação de quantidades adequadas de anticorpos, ou se o fazem, dão origem à formação de anticorpos inespecíficos impróprios para se estabelecer relações de afinidade (LANCEFIELD, 1925; GUGGENHEIM, 1968; PORTIFIELD, 1950; SELBIE et al, 1949; SHERMAN et al, 1943; SOLOWAY, 1942).

Tais resultados iniciais, sugerem que os estreptococos viridantes e os não hemolíticos são antigenicamente heterogêneos. Esses estudos preliminares resultaram ineficazes, provavelmente pela ausência de uma base taxonômica clara, da qual se iniciam as investigações serológicas. A medida que aumenta o conhecimento de novas espécies bem definidas, tem sido demonstrada a possibilidade de um conhecimento maior inter e intra específico, do ponto de vista serológico.

A atenção de diversos pesquisadores ligados à área de Biologia Oral, particularmente os serologistas, tem sido a de desenvolver e aplicar técnicas serológicas com o intuito de contribuir na identificação e caracterização desses microrganismos orais. Assim a existência de diferenças serológicas entre "strains" de *S. mutans* foi primeiramente observada por ZINNER & JABLON (1968) e CROUSAZ & GUGGENHEIM (1966). Pos-

teriormente BRATTALL (1970) relatou a presença de 5 tipos serológicos distintos (originalmente denominados grupos) entre as espécies. Esses serotipos, designados de (a - e), foram demonstrados por imunoeletroforese e imunodifusão com extratos antigênicos. As cepas determinadas serotipo (e) reagiram positivamente com o grupo E de Lancefield, da mesma forma que cepas de *S. uberis* (CULLEN, 1967). Ficou demonstrado que o *S. mutans* tipo antigênico (e) não é idêntico ao grupo antigênico E de Lancefield (LINZER, 1976; PERCH et al, 1974).

Os serotipos relatados por BRATTHALL estendem-se agora até 7, através do reconhecimento dos tipos (f) e (g) (PERCH et al, 1974). Através de aglutinação, utilizando-se antígenos de parede celular, demonstrou-se a possibilidade de se fazer um estudo do reconhecimento com tais serotipos, baseados em testes de precipitação (HARDIE & BOWDEN, 1974b). Vários grupos de pesquisadores tem desenvolvido técnicas de imunofluorescência na identificação de serotipos de *S. mutans* (JABLON & ZINNER, 1966; BRATTHALL, 1972; GRENIER et al, 1973; JABLON et al, 1976; MCKINNEY & THACKER, 1976; THOMSON et al, 1976; HAMA DA et al, 1976).

Estudos detalhados da composição antigênica e o relacionamento serológico entre os estreptococos orais (HARDIE & MARSH, 1978) tem sido realizados com o objetivo de se desenvolver e padronizar técnicas serológicas de precipitação. Esses estudos, feitos em *S. mutans*, tem sido baseados em: 1) confirmação da natureza antigênica de carboidratos de parede celular dos serotipos, não somente entre poucas cepas, mas também às demais, após isoladas; 2) estandarização do método para a produção de antissoros contra esses antígenos de carboidratos; 3) comparação de várias técnicas de extração desses antígenos e 4) estudo e análise das reações cruzadas com antígenos resul-

tantes das várias técnicas de extração empregadas. Estudos preliminares demonstraram que extratos em autoclave de células total promovem reações específicas com antígenos de carboidratos de *S. mutans* (homólogos) reagem com demais serotipos de *S. mutans* e outras espécies (MARSH et al, 1975, 1977).

A ocorrência de reações serológicas cruzadas entre cepas de *S. mutans* e outros estreptococos devido à antígenos de parede celular (ácido teicoico) e de membrana celular (ácido lipoteicoico) tem sido observada e relatada por vários autores (MARKHAM et al, 1975; CHORPENNING et al, 1975; KNOX et al, 1976; KNOX & WICKEN, 1976; HARDIE & BOWDEN, 1976b).

Reações cruzadas foram observadas entre os serotipos (a), (d) e (g) de *S. mutans* e entre os tipos (c) e (e) (BRATTHALL, 1972; PERCH et al, 1974). Nos últimos anos tem-se acumulado inúmeros dados imunológicos com representantes de *S. mutans*, demonstrando tipos de carboidratos específicos como antígenos. Os resultados desses estudos tem sido revistos recentemente por LINZER (1976), LINZER et al (1976) e IACONO et al (1976).

Estudos epidemiológicos em vários grupos de populações demonstraram variações na distribuição de serotipos de *S. mutans*, porém, os tipos c e d parecem ter uma prevalência maior em várias comunidades examinadas (BRATTHALL, 1972; HAMADA et al, 1976; QUERESCHI et al, 1977).

Com relação ao *S. sanguis*, na original subdivisão serológica feita por WASHBURN (1946), tres tipos foram descritos (I, II e I/II) mas não foi identificado nenhum grupo antigênico comum. As cepas pertencentes ao tipo II, são agora consideradas como pertencentes a uma espécie separada, *S. mitior*. O relacionamento entre *S. sanguis* e os estreptococos do

grupo H (HARE, 1935) tem sido visto por muitos pesquisadores, mas muitas questões estão ainda pendentes (COLMAN, 1970; COLMAN & WILLIAMS, 1972; HARDIE, 1975). Estudos sobre a parede celular de cepas de *S. sanguis* do ponto de vista da composição polissacarídica através de reação de aglutinação (excluindo aqueles agora mencionados como *S. mitior*) indicaram a existência de pelo menos dois ou tres tipos distintos, os quais não podem ser distinguidos do ponto de vista fisiológico (HARDIE, 1975).

ROSAN (1973), analisando antígenos presentes nos extratos em autoclave (RANTZ & RANDALL, 1955) de 45 cepas de *S. sanguis* e *S. mitior* através de técnicas de imunodifusão e imunofluorescência regando antissoro contra cepa M-S, pode detectar 5 tipos de antígenos (designados a - e) e as cepas foram distribuídas entre os tipos I, II ou em um "grupo heterogêneo" de acordo com a presença desses antígenos. Tem sido proposto que o antígeno (possivelmente seja um ácido teicoico-glicerol), seja considerado como antígeno do grupo H (ROSAN, 1976). Antígenos tipo ácido lipoteicoico, foram também detectados por CHIU et al (1974) na parede celular e membrana citoplasmática na cepa de ATCC 10556 de *S. sanguis*.

Problemas de ordem prática ainda persistem com relação à identificação de estreptococos do grupo H, levando-se em conta que a escolha de cepas para imunização nos produtos de antissoros comerciais não tem sido padronizados. Dessa forma, a caracterização de estreptococos do grupo H (Inglês) não pode ser comparado com pertencentes ao mesmo grupo H (Americano).

Várias referências tem sido feitas entre *S. mitior* e *S. sanguis*, do ponto de vista fisiológico, serológico no que diz respeito a parede celular, mas há poucas informa -

ções disponíveis com relação a estrutura antigênica do *S. mitior*. KALONAROS & BAHN (1965) descrevem dois grupos serológicos entre cepas, identificados como *S. mitior*, mas desde que todas as cepas examinadas possuem glicose e ramnose na sua parede celular, elas sugerem não serem as mesmas, portanto, denominadas como *S. mitior*, definido por COLMAN & WILLIAMS (1972). Algumas cepas de *S. mitior* dão reações positivas em testes de precipitação com soro do grupo de Lancefield O, M e K e recentemente algumas reações cruzadas como o soro do grupo B tem sido observadas isoladamente, com alguns tipos de animais (COLMAN, 1976).

Antígenos precipitantes comuns, a cepas de *S. sanguis* e *S. mitior* tem sido também mencionadas (WASHBURN et al., 1946; DODD, 1949; ROSAN, 1973; HARDIE & BOWDEN, 1976b).

Observações preliminares com *S. mitior* isolados da cavidade oral, incluindo cepas dextrana positiva e dextrana negativa, feitas por WOODS & HARDIE (não publicado), sugerem que elas sejam serologicamente heterogêneas (cf. HARDIE & MARSH, 1978).

Embora a espécie *Streptococcus milleri* seja fisiologicamente heterogênea, parece possuir um grau considerável de heterogeneidade serológica e reações cruzadas podem ocorrer com os soros dos grupos A, C, F, G e K de Lancefield, (COLMAN, 1976). Nos estudos realizados por PARKER & BALL (1976), 81 cepas foram identificadas como *S. milleri*, das quais 5 reagiram com o grupo A, 5 com o grupo C, 3 com o grupo G e 7 com o grupo F. Estudos comparativos feitos por FACKLAM (1977) demonstraram que de 231 cepas pertencentes as espécies S.M.G.-intermédias, nove reagiram com o grupo A, seis com o grupo C,

53 com o grupo F, tres com o grupo G, duas com o grupo K e seis com o soro do grupo A variante. Cepas de *anginous constellatus* promoveram reações com o soro dos grupos A, C, F e G.

Uma análise antigênica mais detalhada de uma seleção de cepas de *S. milleri* será extremamente valiosa.

Os *Streptococcus salivarius* se apresentam também como outro exemplo de espécie que são fisiologicamente homogêneas, mas serologicamente heterogêneas (COLMAN, 1976). Cepas designadas como tipo I (SHERMAN et al, 1943) reagem com o grupo K de Lancefield e podem dar reações com antissoro contra estreptococos MG (MIRICK et al, 1944; WILLIAMS, 1956; MONTAGUE & KNOX, 1968). Cepas do tipo III de *S. salivarius* não apresentaram reações positivas com nenhum desses antissoros (MONTAGUE & KNOX, 1968). De 81 cepas de *S. salivarius* examinados por FAC KLAM (1977), 35 reagiram com o grupo K e 3 com o grupo F, enquanto PARKER & BALL (1976) relataram 7/14 cepas grupo K positivas.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

Amostras de estreptococos das espécies *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, foram obtidas da Faculdade de Odontologia da Universidade de Umea (Suécia), isoladas por Dr. B. Krosse da Universidade de Göteborg e gentilmente cedidas por Dr. Jan Carlsson (Quadro 1).

2. MÉTODOS

2.1. Semeadura do Material

Amostras liofilizadas dos estreptococos foram inoculadas em meio de tioglicolato (Thioglycollate Medium without indicator, 135C-BBL) adicionado de uma pequena quantidade de carbonato de cálcio, previamente esterilizado a 120°C por 15 minutos, em autoclave. Posteriormente ao inóculo, os tubos foram incubados a 37°C, durante 24-72 horas em jarra tipo Brewer, em condições de microaerofilia, usando-se envelopes de GASPAC,70304 (BBL).

QUADRO 1 - Relação das espécies de estreptococos utilizados nos experimentos.

Material	Abreviação	Código da Univ. da Umea
<i>Streptococcus sanguis</i>	Ss.	ATCC 10556
<i>Streptococcus salivarius</i>	S. sal.	ATCC 9759
<i>Streptococcus mitis</i>	S. mit.	OV-71
<i>Streptococcus mutans</i>	S. mut.	"Ingbritt"R.(IBR)
<i>Streptococcus faecalis</i>	S.f.	NCTC 775

Amostras de estreptococos isoladas por Dr. B. Krasse, Göteborg (Suécia).

Após o crescimento bacteriano, com o auxílio da alça de platina esterilizada e resfriada, foi feita semeadura em tubos contendo meio de agar-sangue. Os tubos foram incubados a 37°C, durante 24-72 horas, em condições de microaerofilia já descritas acima.

2.2. Conservação das Amostras

As amostras foram mantidas durante toda a execução do trabalho, em duas coleções:

a) Na primeira, as amostras foram inoculadas em meio de tioglicolato, distribuído em camada alta, em tubos de rosca (13x100mm) e adicionado de aproximadamente 0,1 g de carbonato de cálcio por tubo. Com as tampas frouxas, os tubos foram incubados em microaerofilia, em jarra tipo Brewer, a 37°C, durante 24-72 horas. Em seguida, os tubos foram removidos da jarra, apertando-se as roscas para evitar a penetração de ar. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente, durante 30 dias, quando a coleção era então renovada.

b) Na outra coleção, as amostras foram estocadas em leite, no "freezer", à temperatura de -20°C. Leite desnatado em pó foi dissolvido em água destilada (solução a 10%) e autoclavado a 115°C, por 20 minutos. Para esta estocagem, 2,0 ml de leite foram distribuídos assepticamente em pequenos tubos de rosca (13x45 mm), adicionando-se 0,5 ml de crescimento recente da amostra, em meio de tioglicolato (BBL). Esta coleção era renovada a cada 6 meses.

Em ambas as coleções (previamente a renovação), foram feitos controles de pureza, inoculando-se a suspensão bacteriana em placas de agar-sangue e em meio de agar mitis-salivarius

(BBL) através do método de estria em placa. Posteriormente a sua incubação a 37°C, em microaerofilia, era observada a morfologia colonial do crescimento bacteriano.

2.3. Preparo de antígenos bacterianos para a obtenção de antissoros

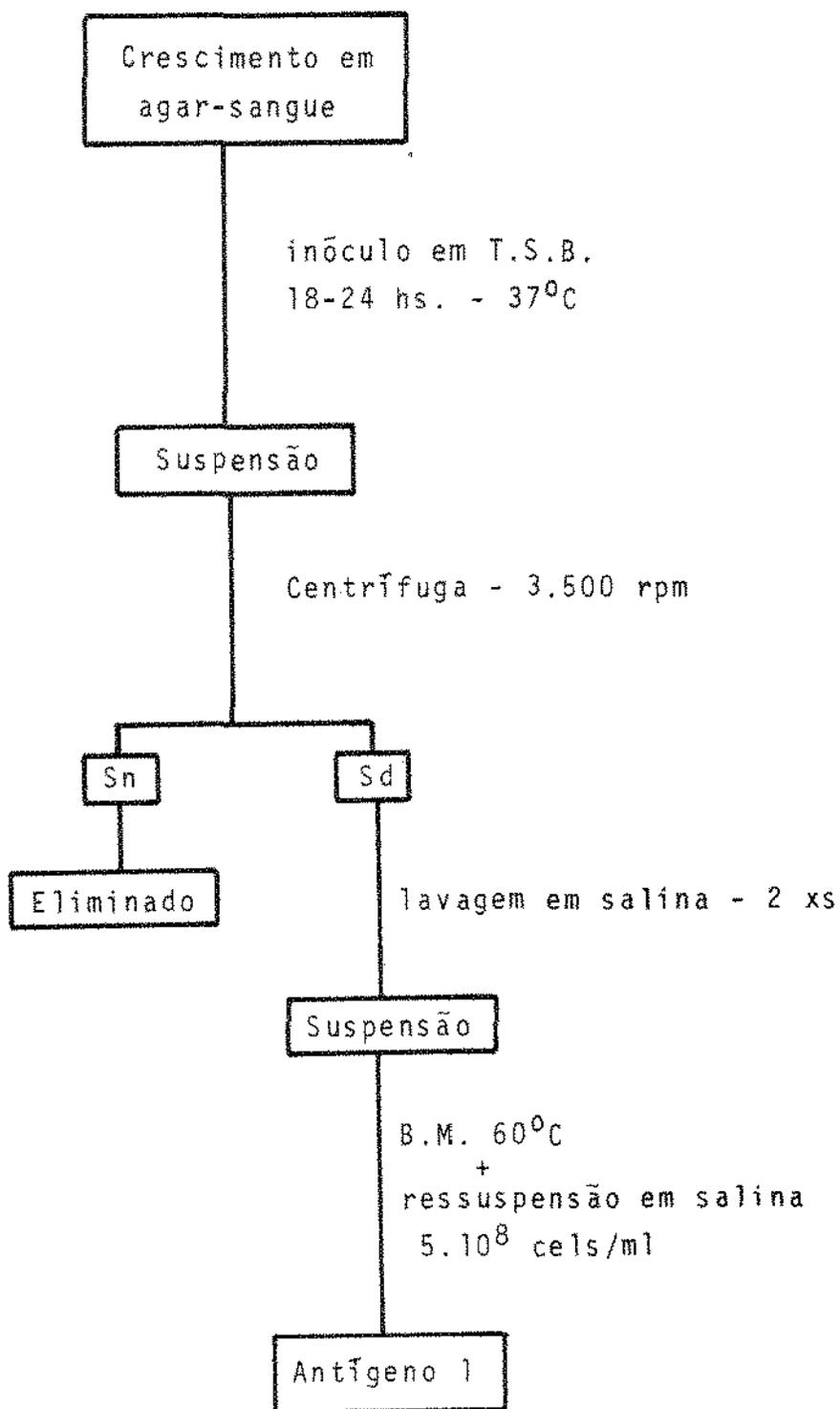
À tubos de ensaio contendo meio de cultura de TSB (Trypticase Soy Broth - BBL) foram inoculados material bacteriano das espécies de estreptococos (crescidos em meio de agar - sangue), permanecendo por 18 horas a 37°C. As células foram centrifugadas, lavadas duas vezes, mantidas em banho-maria a 60°C por 30 minutos e posteriormente ressuspensas em salina numa densidade de $5 \cdot 10^8$ cells/ml, segundo SEELEMAN & OBIGER (1958) (antígeno 1). A metodologia empregada no preparo do antígeno 1, baseou-se naquela descrita por BRATTHALL (1969). As suspensões foram preparadas semanalmente a cada série de injeções (Esquema 1).

2.4. Inoculações

Antissoros para os antígenos descritos no item 2.3. foram obtidos através da inoculação em coelhos adultos, mantidos em dieta comum, com suspensões bacterianas padronizadas. Foram injetadas durante 4 semanas (tres dias consecutivos a cada semana). As tres primeiras injeções foram de 0,5 ml cada, e as demais de 1,0 ml de suspensão de células (emulsionadas em Adjuvante de Freund incompleto) preparadas semanalmente e mantidas no congelador (Quadro 2).

O esquema de imunização empregado para esse tipo de antissoro, baseou-se naquele utilizado por BRATTHALL (1969), com

ESQUEMA 1 - Preparo de antígenos bacterianos para imunização.



QUADRO 2 - Esquema de imunização dos antissoros obtidos pela injeção no linfonódulo e intramuscular de coelho, com suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. faecalis*.

ANTÍGENO	COELHO Nº	Nº DE INJEÇÕES DO ANTÍGENO	SIGLA DO ANTÍSSORO
Ss ATCC	167	12(im-1fn)	AS Ss ATCC 167
S sal ATCC	169	12(im-1fn)	AS S sal ATCC 169
S mit OV	170	12(im-1fn)	AS S mit OV 170
S mut IBR	171	12(im-1fn)	AS S mut IBR 171
S f NCTC	172	12(im-1fn)	AS S f NCTC 172

AS Ss ATCC - antissoro contra *S. sanguis*

AS S sal ATCC - antissoro contra *S. salivarius*

AS S mit OV - antissoro contra *S. mitis*

AS S mut IBR - antissoro contra *S. mutans*

AS S f NCTC - antissoro contra *S. faecalis*

12(im-1fn) - nove injeções intramusculares e
tres injeções linfonódulo

modificações introduzidas em nosso laboratório (injeções no linfonódulo).

2.5. Sangria, Preparo e Conservação dos Antíssoros

Preliminarmente à injeção de antígenos, fez-se uma sangria e o soro normal obtido (SN) foi conservado no congelador, para testes posteriores como controle nas reações serológicas.

As sangrias, conforme o esquema de imunização utilizado, foram efetuadas após a última injeção de antígeno.

Nas sangrias, fez-se um corte longitudinal na veia marginal da orelha do coelho e recolheu-se o sangue (10 a 30 ml) em um frasco de vidro. O sangue foi deixado de uma a duas horas em temperatura ambiente. Em seguida separou-se o soro centrifugando-se durante 5 minutos a 1500 rpm (centrífuga Alpha-soro IA). Distribuiu-se o material em vidros (5 ml cada) e adicionou-se Mertiolato numa concentração final de 1:10.000.

2.6. Preparo de Antígenos Utilizados nos Testes Serológicos

No preparo de antígenos bacterianos para serem utilizados nos testes serológicos em reação com os antíssoros obtidos, utilizou-se o método de Rantz & Randall (1955).

Antígenos preparados segundo Rantz & Randall, foram obtidos, inoculando-se o material por 18-24 horas em meio líquido, composto de 20 grs de Tryptose (Difco), 2 grs de dextrose, 5 grs de cloreto de sódio e 2,5 grs de Na_2HPO_4 p/l. de água destilada. Posteriormente ao crescimento, quantidades de 40 ml foram colocadas em tubos de centrífuga e autoclavadas. Após centrifugação eliminou-se o sobrenadante e ao sedimento adicionou-se 0,5 ml de cloreto de sódio 0,9%. O sedimento foi então

suspensão com leve agitação. Após esse procedimento, os tubos foram autoclavados por 20 minutos a 1 atmosfera. Em seguida, centrifugou-se a suspensão resultante, eliminando-se o sedimento, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (Esquema 2).

2.7. Testes Serológicos

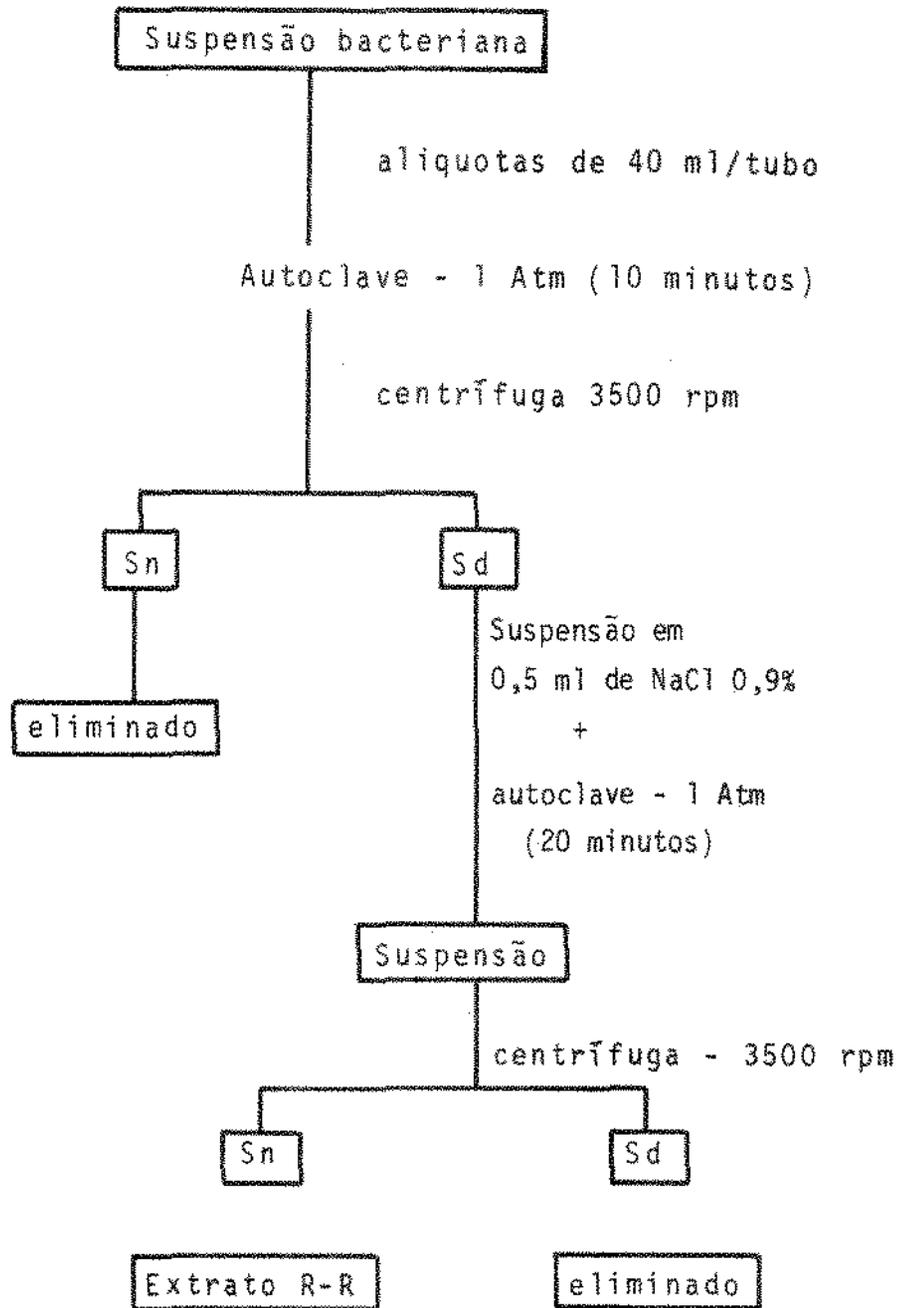
2.1.1. Dupla Difusão em Gel de Agar

Testes serológicos de dupla difusão em gel de agar a 1% foram realizados com os antissoros AS. Ss ATCC 167, AS. S sal. ATCC 169, AS. S mit OV 170, AS S mut IBR 171, AS Sf NCTC 172 em reação com os antígenos de suspensões bacterianas preparadas de acordo com o item 2.6. Os testes foram feitos em gel de agar a 1% (OUCHTERLONY, 1949, 1958 e 1962) em tampão PBS 0,01M pH 7,0, tampão veronal 0,025M pH 8,6 e em agar água (HÖFLING, 1975).

2.7.2. Determinação do Título dos Antissoros

Foram utilizados testes serológicos de dupla difusão em gel de agar na determinação do título dos antissoros obtidos. Os antissoros foram diluídos em salina 0,85%, seguindo-se uma progressão geométrica de razão 2.

ESQUEMA 2 - Preparo de extratos bacterianos para serem usados nas reações serológicas, segundo RANTZ & RANDALL.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. TÍTULO DE ANTISSOROS

Os testes serológicos de dupla difusão (Ouchterlony) em combinações homólogas, utilizados para a determinação do título de antissoros obtidos pela injeção de suspensões bacterianas padronizadas de *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. faecalis*, permitiram verificar diferenças no título de anticorpos, tal como ilustra o Quadro 3. Os títulos máximos obtidos para AS Ss ATCC 167 e AS Smut IBR 171 revelaram valores de 16 na injeção com antígenos de suspensões bacterianas padronizadas segundo BRATTHALL. Os resultados obtidos nos testes com os antissoros AS Ssa1 ATCC 169 e AS Sf NCTC 172 mostraram valores de 4, enquanto o AS Smit OV 170 revelou valor de 2 através de inoculações com antígenos obtidos segundo o item 2.3. O soro normal usado como controle não apresentou reação.

2. TESTES SEROLÓGICOS

Foram analisados os resultados obtidos em rea-

QUADRO 3 - Título máximo dos antissoros obtidos nas imunizações

COELHO Nº	ANTIGENO	CÓDIGO DO ANTISSORO	TÍTULO* DOS ANTISSOROS NOS TESTES DE DUPLA DI FUSÃO	SN
167	<i>S. sanguis</i>	As Ss ATCC 167	16	-
169	<i>S. salivarius</i>	AS S sal ATCC 169	4	-
170	<i>S. mitis</i>	AS S mit OV 170	2	-
171	<i>S. mutans</i>	AS S mut IBR 171	16	-
172	<i>S. faecalis</i>	AS S f NCTC 172	4	-

* Título do antissoro representado pelo inverso da diluição

SN - Soro Normal

- não apresentou reação

ções serológicas de dupla difusão com os AS Ss ATCC 167, AS S sal ATCC 169, AS S mit OV 170, AS S mut IBR 171 e AS S f NCTC 172, em reação com antígenos (extratos de suspensões bacterianas) obtidos segundo RANTZ & RANDALL, de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans* e *S. faecalis*.

A análise das linhas de precipitação (LP) observadas foram feitas em função dos sistemas imunoprecipitantes detectados.

2.1. Testes serológicos empregando-se AS Ss ATCC 167.

Streptococcus sanguis

As reações serológicas de dupla difusão em gel de agar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, segundo RANTZ & RANDALL (R-R) apresentaram-se positivas, o mesmo ocorrendo quando foram feitos testes em agar a 1% em tampão veronal e tampão PBS (Quadro 4).

2.2. Testes serológicos empregando-se AS S sal ATCC 169

Streptococcus salivarius

Os resultados dos testes em agar a 1% em tampão veronal, e tampão PBS demonstraram reações fracamente positivas com os antígenos R-R, não se observando reações positivas com *S. salivarius* em agar-água a 1% (Quadro 5).

2.3. Testes serológicos empregando-se AS S mit OV 170.

Streptococcus mitis

As reações serológicas efetuadas em agar a 1% em tampão veronal e tampão PBS, com os antígenos de suspensões bacte

rianas obtidas, revelaram o aparecimento de reações fracamente positivas.

Os testes serológicos efetuados em agar-água a 1% não demonstraram reações positivas (Quadro 6).

2.4. Testes serológicos empregando-se AS S mut IBR 171

Streptococcus mutans

Nas reações com *S. mutans* em agar a 1%, em água, tampão veronal e tampão PBS pode-se verificar reações positivas com os antígenos obtidos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (Quadro 7).

2.5. Testes serológicos empregando-se AS Sf NCTC 172

Streptococcus faecalis

As observações decorrentes da análise das reações com *S. faecalis* revelaram o aparecimento de reações fracamente positivas com relação ao antígeno R-R, efetuados em agar a 1% em tampão veronal e tampão PBS.

Nos testes efetuados com *S. faecalis* em agar-água não se verificou reação (Quadro 8).

3. REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS

3.1. Testes serológicos empregando-se AS Ss ATCC 167

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de agar a 1% em tampão veronal, empregando-se o AS Ss ATCC 167, em reação com antígenos de suspensões bacteria

nas, obtidos segundo RANTZ & RANDALL (R-R), de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* revelaram o aparecimento de reações positivas para *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. faecalis*, e reações fracamente positivas para *S. mitis*. Reações negativas foram observadas para a espécie *S. mutans* (Quadro 9). Observou-se somente uma LP, nas reações positivas e fracamente positivas obtidas (Figura 1).

3.2. Testes serológicos empregando-se AS S sal ATCC 169

As reações serológicas de dupla difusão em gel de agar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas segundo R-R, revelaram o aparecimento de reações fracamente positivas para o homólogo *S. salivarius* e os heterólogos *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* (Quadro 10). Observou-se somente uma LP nas reações fracamente positivas (Figura 2).

3.3. Testes serológicos empregando-se AS S mit OV 170

Nos testes serológicos empregando-se o AS S mit OV 170 em reação com antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis*, observaram-se reações fracamente positivas para o homólogo *S. mitis* (Figura 3), não se observando reações positivas para as demais espécies (Quadro 11).

3.4. Testes serológicos empregando-se AS S mut IBR 171

Nas reações serológicas de dupla difusão em gel de agar a 1% em tampão veronal com o antissoro AS S mut IBR 171 em reação com antígenos obtidos segundo R-R, pode-se observar rea

ções positivas com o homólogo *S. mutans* e os heterólogos *S. salivarius* e *S. faecalis*, não se verificando reações positivas com *S. sanguis* e *S. mitis* (Quadro 12). Nas reações positivas com *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. faecalis* observaram-se somente uma LP (Figura 4).

3.5. Testes serológicos empregando-se o AS Sf NCTC 172

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de agar a 1% em tampão veronal empregando-se o AS Sf NCTC 172 com antígenos R-R, revelaram o aparecimento de reações positivas apenas para o homólogo *S. faecalis*, e reações fracamente positivas para *S. sanguis* e *S. mutans* (Quadro 13).

As reações com os antígenos de *S. salivarius* e *S. mitis* não apresentaram reações positivas (Figura 5).

QUADRO 4 - *S. sanguis* contra AS Ss ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL - (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES NO GEL DE ÁGAR EM		
	água	veronal	PBS
AS Ss ATCC 167	+	+	+

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 5 - *S. salivarius* contra AS S sal ATCC 169. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES NO GEL DE ÁGAR EM		
	água	veronal	PBS
AS S sal ATCC 169	-	±	±

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 6 - *S. mitis* contra AS S mit OV 170. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADOS DAS REAÇÕES NO GEL DE ÁGAR EM		
	água	veronal	PBS
AS S mit OV 170	-	±	±

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 7 - *S. mutans* contra AS S mut IBR 171. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas.

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES NO GEL EM ÁGAR EM		
	água	veronal	PBS
AS S mut IBR 171	+	+	+

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 8 - *S. faecalis* contra AS S f NCTC 172. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES NO GEL DE ÁGAR EM		
	água	veronal	PBS
AS S f NCTC 172	-	±	±

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 9 - Antissoro AS Ss ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS COM ANTÍGENOS DE				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS Ss ATCC 167	+	+	-	‡	+

- + reações positivas
- reações negativas
- ‡ reações fracamente positivas

QUADRO 10 - Antissoro AS S sal ATCC 169. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS COM ANTÍGENOS DE				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS S sal ATCC 160	±	±	±	±	±

+ reações positivas

- reações negativas

± reações fracamente positivas

QUADRO 11 - Antissoro AS S mit OV 170. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS COM ANTÍGENOS DE				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.Salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS S mit OV 170	-	-	-	±	-

+ reações positivas

- reações negativas

± reações fracamente positivas

QUADRO 12 - Antissoro AS mut IBR 171. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS COM ANTÍGENOS DE				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS S mut IBR 171	-	+	+	-	+

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

QUADRO 13 - Antissoro AS S f NCTC 172. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R).

ANTISSORO	RESULTADO DAS REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS COM ANTÍGENOS DE				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS S f NCTC 172	±	-	±	-	+

- + reações positivas
- reações negativas
- ± reações fracamente positivas

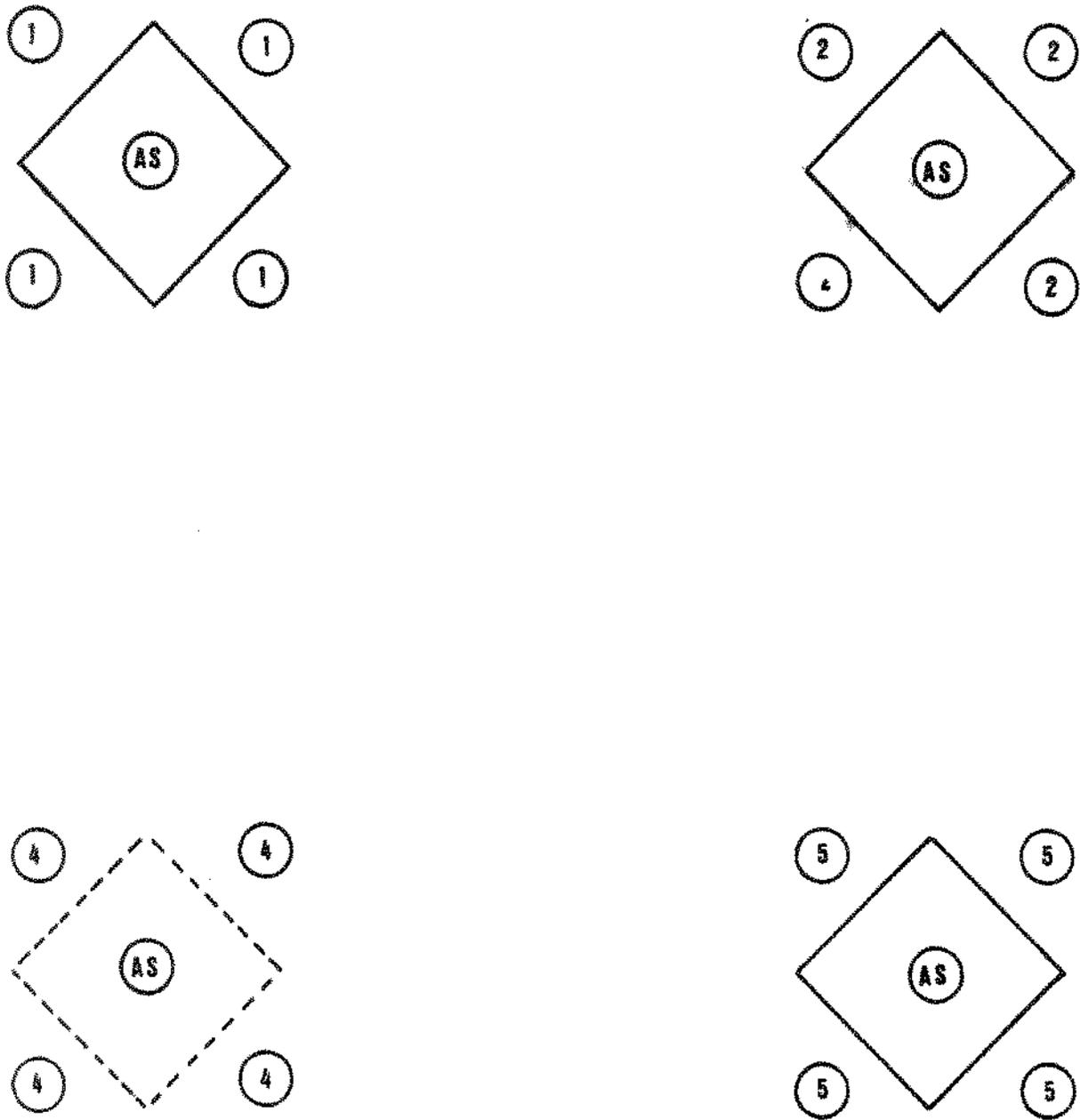


FIGURA 1 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS Ss ATCC 167. (Ag): Antígenos: (1) *S. sanguis*; (2) *S. salivarius*; (4) *S. mitis*; (5) *S. faecalis*.

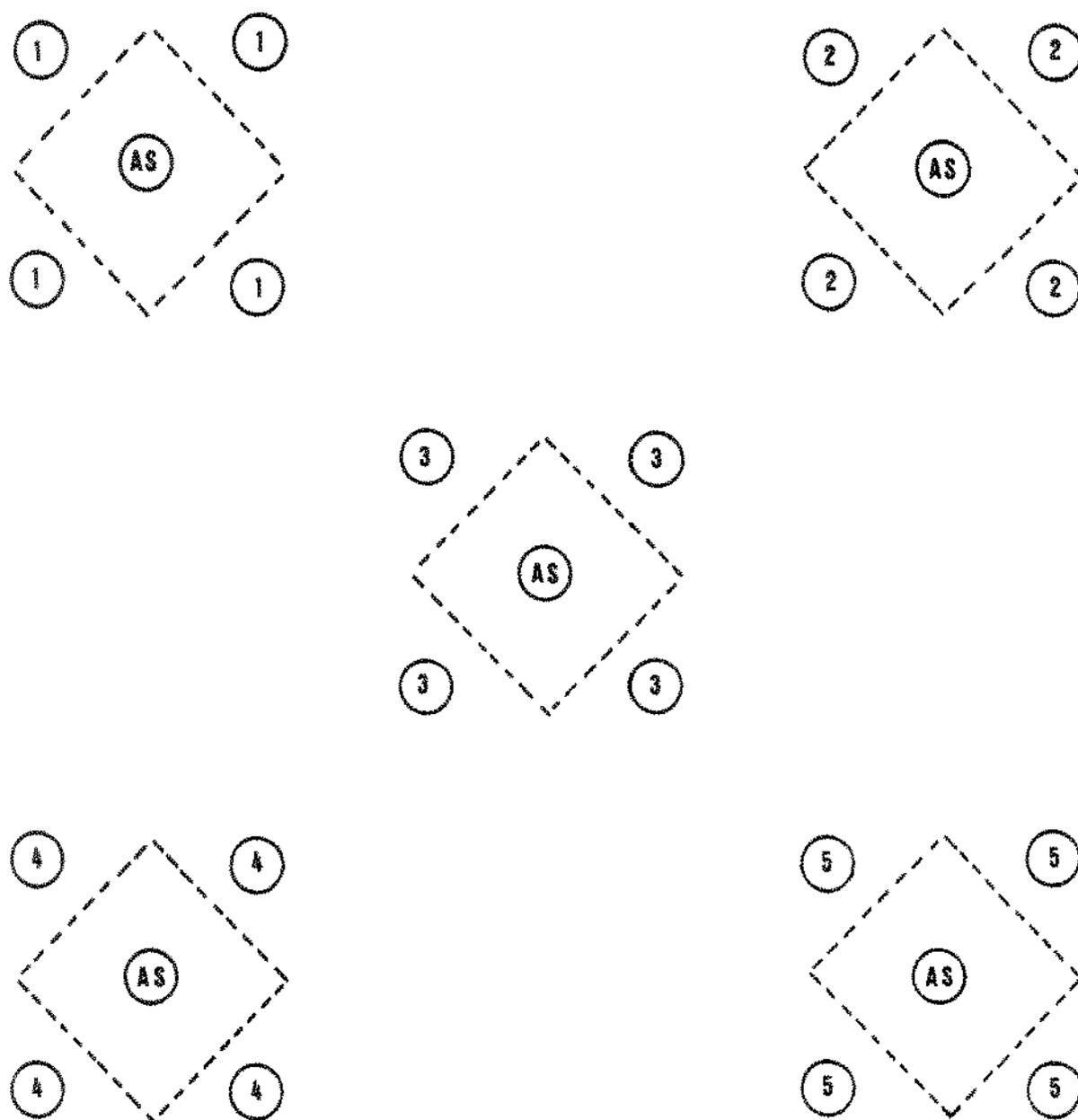


FIGURA 2 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL. (AS): AS 5 sal ATCC 169. - (Ag): Antígenos: (1) *S. sanguis*; (2) *S. salivarius*; (3) *S. mutans*; (4) *S. mitis*; (5) *S. faecalis*.

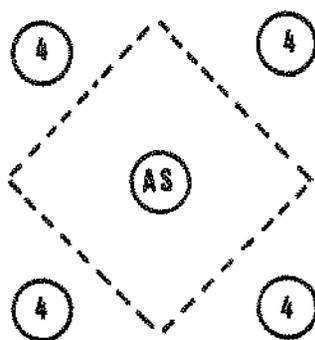


FIGURA 3 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tam
pão veronal com antígenos de suspensões bacteriana-
nas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS S mit
OV 170. (Ag): Antígenos: (4) *S. mitis*.

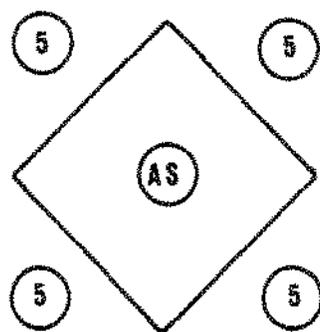
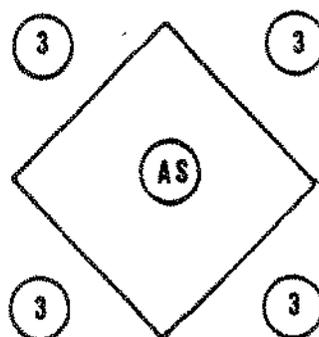
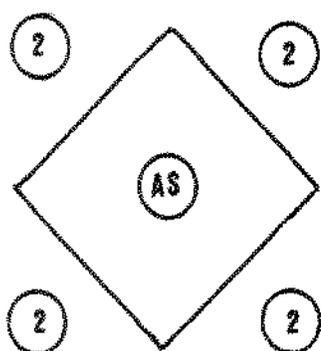


FIGURA 4 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS S mut IBR 171. (Ag): Antígenos: (2) *S. salivarius*; (3) *S. mutans*; (5) *S. faecalis*.

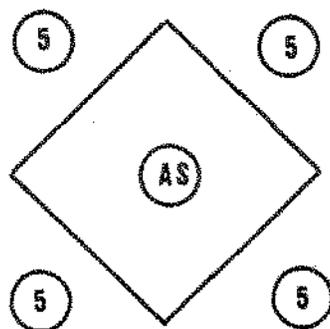
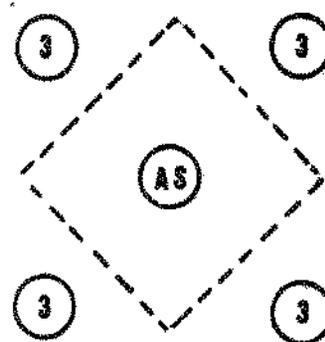
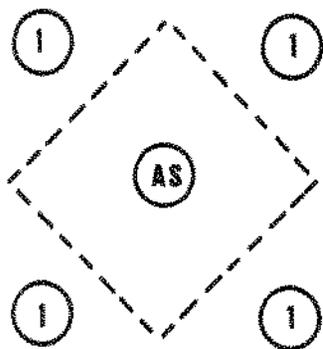


FIGURA 5 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo RANTZ & RANDALL (R-R). (AS): AS Sf NCTC 172. (Ag): Antígenos: (1) *S. sanguis*; (3) *S. mutans*; (5) *S. faecalis*.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A pesquisa de antígenos específicos, como ácido hialurônico, polissacarídeos, ácidos teicônicos, mucopeptídeos e proteínas M e T, presentes na cápsula e na parede celular de estreptococos, tem sido de fundamental importância na identificação e caracterização desses microrganismos. No que diz respeito à bactérias da cavidade oral, com particular referência aos estreptococos e lactobacilos, as pesquisas tem sido orientadas com o objetivo de se ter um maior conhecimento da estrutura antigênica dessas bactérias (KNOX, 1970). Assim, pode-se observar que há um certo número de informações disponíveis com relação a estudos com antígenos de vários estreptococos da cavidade oral, incluindo *Streptococcus salivarius* (MIRICK et al, 1944; WILLIAMS, 1956; STEWART & MC KEEVER, 1963; WILLERS et al, 1964; MONTAGUE & KNOX, 1968; KOTHAR et al, 1971; HORSFALL, 1951), estreptococos do Grupo F (OTTENS & WINKLER, 1962; MICHEL & KRAUSE, 1967; WILLERS et al, 1964; HUIS IN'T VELD, 1973) e mais recentemente, vários serotipos de *S. mutans* tem sido também investigados (BLEIWELS et al, 1971; VAN DE

RIJN & BLEIWELS, 1973; VAUGHT & BLEIWEIS, 1974; BURGESS & EDWARDS, 1973; SLADE & SLAMP, 1972; MUKASA & SLADE, 1973; LINZER & SLADE, 1974; IACONO et al, 1975).

O estudo de tais substâncias antigênicas, particularmente no preparo de antissoros específicos, tem sido de fundamental importância em estudos de identificação dessas espécies. Assim, inúmeras técnicas tem sido utilizadas e desenvolvidas na tentativa de serem um sistema útil na identificação desses microrganismos. (FULLER, 1938; LANCEFIELD, 1925 ; RANTZ & RANDALL, 1955; BRATTHALL, 1969; HARDIE & BOWDEN, 1976).

Os estudos efetuados em nossas investigações, teve como objetivo principal, verificar se as espécies de estreptococos (isoladamente) possuem antígenos, os quais não possam ser detectados em outros estreptococos, ou outras bactérias, e secundariamente, analisar o grau de relacionamento serológico entre essas espécies, em função da metodologia empregada.

Os resultados obtidos nos testes serológicos para a determinação do título de antissoros para as espécies de estreptococos analisadas, apresentaram diferenças significativas quando os títulos máximos obtidos foram analisados. Os antissoros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:2, 1:4 e 1:16, quando determinados pelo teste de Ouchterlony. Tais títulos indicaram - de modo geral - uma concentração baixa de anticorpos para as várias espécies de estreptococos, quando comparadas, sendo que em alguns casos - como para as espécies *S. salivarius*, *S. faecalis* e *S. mitis* - os valores encontrados são muito menores, como se pode observar no Quadro 3. Tais resultados, confirmam observações preliminares realizadas por HÖFLING (1981), quando os resultados obtidos nos tes

tes serológicos para a determinação do título dos antissoros para o *S. sanguis*, apresentaram valores de 1:4, 1:8 e 1:16 quando os títulos máximos foram obtidos, e que tais antissoros demonstraram, individualmente, um comportamento diferente, quando na interpretação das reações serológicas de dupla difusão em reação com os antígenos obtidos por tratamentos diversos. Tais resultados, portanto, quando comparados com nossas observações, parecem indicar que as espécies de estreptococos analisadas, são bastante heterogêneas com relação à sua capacidade imunizante, o que vem justificar, de certa forma, a baixa reatividade das espécies *S. salivarius*, *S. faecalis* e *S. mitis* nas reações serológicas, quando comparadas.

O problema parece consistir no fato de que para o grupo viridantes - dos quais muitos dos estreptococos orais pertencem - tais estreptococos não são capazes de induzir a formação de quantidades de anticorpos adequadas, quando injetados em animais experimentais, ou se o fazem, os anticorpos parecem ser inespecíficos e, portanto, inadequados para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica (LANCFIELD, 1925; SOLOWAY, 1942; SHERMAN et al, 1943; SELBIE et al, 1949; PORTIFIELD, 1950; GUGGENHEIM, 1968).

Os resultados obtidos nas reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar com os antissoros obtidos, em reação com antígenos de suspensões bacterianas segundo RANTZ & RANDALL (R-R), onde ágar-gel em água, tampão veronal e tampão PBS foram testados, demonstraram que as reações feitas em ágar-água e ágar-PBS, parecem ser menos adequadas quando comparadas com ágar-gel em tampão veronal, como podemos verificar nos Quadros 5, 6 e 7. Tais observações indicam a necessidade de se conhecer o comportamento dos reagentes (antígeno e

antissoro) nos diversos tipos de gel de ágar empregados, antes de se utilizarem definitivamente os dados para aplicação em estudos serológicos. Esses resultados, confirmam observações feitas anteriormente por HÖFLING (1981), o qual verificou a necessidade de se padronizar as reações, quando testes semelhantes foram efetuados, demonstrando que o tipo de tampão, tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) e distância entre os orifícios, podem constituir fatores limitantes nessas reações, além de outros fatores específicos como tipo de gel empregado, temperatura, concentração de ágar, pureza do antígeno, tamanho da molécula do antígeno, configuração molecular, etc.

Os dados obtidos nas reações homólogas e heterólogas, através dos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal empregando-se o AS Ss ATCC 167 e AS S mut IBR 171 respectivamente, contra *S. sanguis* e *S. mutans*, em reação com antígenos de suspensões bacterianas (R-R), demonstraram que ambos os antissoros reagem especificamente com os homólogos - *S. sanguis* e *S. mutans* - mas que ambos são capazes de reação cruzada com os demais antígenos heterólogos testados, com exceção de AS Ss ATCC 167 não reagir com *S. mutans* e o AS S mut 171 não reagir com *S. sanguis*. Tais resultados, indicam que as substâncias antigênicas extraídas - possivelmente polissacarídeos grupo específicos - possuem determinantes antigênicos que são comuns às várias espécies, quando comparadas, o que vem justificar, dessa forma, as reações cruzadas detectadas. Essas observações, de modo geral, vem confirmar inúmeras investigações levadas a efeito por vários pesquisadores, nos últimos anos (BRATTHALL, 1969, 1972; JABLON & ZINNER, 1966; TOW & SHKLAIR, 1967; PERCH, 1974; HAR-

DIE & BOWDEN, 1974b), os quais tem demonstrado a presença de reações cruzadas entre *S. mutans* e outros estreptococos orais, particularmente *S. sanguis* e *S. salivarius* em estudos serológicos.

A ausência de reação entre o AS S mut IBR 171 e a espécie *S. sanguis*, assim como também com relação ao AS Ss ATCC 167 e a espécie *S. mutans* demonstraram, que tais resultados, em princípio, parecem sugerir que nesse sistema de reação, o AS Ss ATCC 167 é capaz de reagir especificamente com o homólogo *S. sanguis*, sem apresentar reação cruzada com o heterólogo *S. mutans* testado, o mesmo ocorrendo para o AS S mut IBR 171 com relação *S. sanguis*, o que nos leva a considerar que esse extrator é capaz de extrair determinantes antigênicos do *S. sanguis* e *S. mutans* que não são comuns aos demais antígenos testados.

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-veronal a 1% com antígenos de suspensões bacterianas R-R em reação com o AS S sal ATCC 169, revelaram que esse antissoro é capaz de reação cruzada com o homólogo *S. salivarius* e os heterólogos *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* e *S. sanguis*. Como pode-se verificar pelo Quadro 10 e Fig. 2, essas reações foram fracamente positivas, observando-se apenas uma única e fraca linha de precipitação. Tal fato quando associado ao baixo título de anticorpos observado pelo teste de Ouchterlony, vem confirmar considerações anteriores com relação à pouca capacidade dessas espécies de induzirem a formação de quantidades de anticorpos suficientes para a aplicação em estudos serológicos. Tais fatos se tornam muito mais evidentes, quando os resultados obtidos nos testes serológicos com o AS S mit OV 170 e AS S f NCTC 172 em reação

com os antígenos homólogos e heterólogos são analisados (Quadros 11 e 13). Tais resultados demonstraram que o AS S mit OV 170 reagiu fracamente com o homólogo, não se observando nenhuma reação com as demais espécies testadas. Com relação ao AS S f NCTC 172, esse antissoro foi capaz de reagir com o homólogo *S. faecalis*, apresentando uma reação fracamente positiva com os heterólogos *S. mutans* e *S. sanguis*, não se observando, no entanto, reação com as demais espécies, quando testados.

Embora possamos afirmar com segurança, que a estrutura de estreptococos orais não esteja totalmente conhecida até o momento, os dados obtidos através da ampla literatura a respeito, demonstram que diferentes componentes estruturais, tais como: polissacarídeos, enzimas extracelulares, proteínas, carboidratos, peptidoglicanos, ácido teicônico e ácido lipoteicônico - presentes nesses microrganismos - podem estar envolvidos no aparecimento dessas reações cruzadas.

Tais fatos, vem confirmar claramente, a dificuldade de não se ter ainda, um sistema útil para a identificação desses estreptococos, sendo que, com relação a outros estreptococos - como os estreptococos hemolíticos - métodos serológicos tem sido de grande valia. A técnica de LANCEFIELD (1933) a qual divide as bactérias em 17 grupos (A-H, K-S), tem demonstrado ser um dos métodos mais simples e eficazes para a identificação desses microrganismos, o mesmo acontecendo com relação aos extratos em autoclave de RANTZ & RANDALL (1955).

O aspecto fundamental de estudos atuais tem sido determinar até que ponto técnicas serológicas possam ser utilizadas em estudos de microrganismos orais. Estudos realizados através de reações de aglutinação (GRUBER & DURHAM, 1896)

demonstraram que a célula bacteriana continha muitas estruturas que podiam atuar como antígeno. Mais precisamente, o problema consistia em se determinar no "mosaico" de antígenos, um ou mais antígenos que podiam ser demonstrados em cepas classificadas como por exemplo *S. mutans* mas não em outras bacterias. Estudos anteriores (ZINNER et al, 1965a; JABLON & ZINNER, 1966; GIBBONS et al, 1966) tem demonstrado que antissoros contra cepas de *S. mutans* são capazes de reação cruzada com cepas heterólogas em estudos de imunodifusão.

Quando os primeiros antissoros polivalentes foram testados contra extratos antigênicos homólogos e heterólogos, muitas linhas de precipitação foram formadas. Tais observações, vem confirmar a idéia de que os antissoros são estimulados por um "mosaico" de antígenos. Tem sido demonstrado, que as reações são parcialmente o resultado de anticorpos contra polissacarídeos extracelulares. Tem sido observado que preparações de polissacarídeos (dextrana) - devido às diferenças no tamanho dos sítios de combinação dos anticorpos - podem apresentar mais que uma linha de precipitação (SCHLOSSMAN & KUBAT, 1962). Essa pode ser a razão por que muitas das linhas de precipitação originais são excluídas, quando antissoros são produzidos de crescimentos celulares em meio de glicose. Outra razão para a multiplicidade de linhas de precipitação pode ser a heterogeneidade do material antigênico usado na imunização (polissacarídeos), GUGGENHEIM & NEWBORN (1969) relatam que uma cepa de estreptococos cariogênicos pode conter muitas glicosil-transferases, as quais são responsáveis pela formação de uma mistura de glucanos. Se as diferenças estruturais dessas substâncias incluem determinantes antigênicos da molécula, é possível que mais de uma linha de precipitação o-

corra. De qualquer forma, em qualquer caso, parece importante que antíssoros devam ser testados em relação a presença de anticorpos contra polissacarídeos extracelulares antes de se iniciarem investigações com o propósito de classificação. Tal recomendação possui também relevância em estudos serológicos com *S. sanguis* e *S. salivarius*. O conteúdo de anticorpos anti-dextrana pode ser testado através de preparações comerciais de dextrana.

Os resultados obtidos nesse trabalho, indicam a necessidade de se fazerem estudos com relação a novas metodologias que possam extrair determinantes antigênicos que não apresentem reação cruzada com os heterólogos, assim como também realizar estudos com outros componentes das células bacterianas - ácidos teicônicos, proteínas M e T, polissacarídeos extracelulares, ácidos lipoteicônicos, etc. - a fim de se obter antíssoros que possam ser utilizados em estudos de identificação de estreptococos orais.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os estudos realizados no presente trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. A injeção de suspensões bacterianas de estreptococos induzem a formação de anticorpos em coelhos. Essas espécies se comportaram diferentemente com relação à sua capacidade imunogênica;
2. Os antissoros obtidos para as espécies de estreptococos estudadas, se comportaram diferentemente, quando testados em reações serológicas com antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. Salivarius*, *S. mutans* e *S. faecalis*;
3. Os antissoros obtidos pela inoculação desses estreptococos reagem com o antígeno ho-

mólogo e apresentam reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão em gel de ágar;

4. De modo geral, os estreptococos analisados demonstraram não serem capazes de induzir a formação de quantidades de anticorpos adequadas, quando injetados em animais experimentais, ou se o fazem, tais anticorpos parecem ser inespecíficos e, portanto, inadequados para a identificação desses microrganismos.

RESUMO

RESUMO

Com o objetivo de contribuir para a identificação de estreptococos da cavidade oral, particularmente relacionados com a cárie dentária, antissoros obtidos para *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. mitis* e *S. faecalis*, foram utilizados nas reações serológicas em reação com antígenos de suspensões bacterianas desses microrganismos.

Esses antissoros se comportaram diferentemente quando testados em reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar.

Os dados obtidos através dos estudos serológicos, demonstraram que as espécies de estreptococos estudadas se comportaram diferentemente quando testados em reação com os antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. faecalis*.

As reações serológicas efetuadas entre homólogos e heterólogos - quando estudos comparativos foram feitos entre as espécies - demonstraram que os antissoros obtidos des

As espécies de estreptococos reagem com o antígeno homólogo e apresentam reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão em gel de ágar.

Os estudos comparativos feitos com os estreptococos, indicaram de modo geral, não serem capazes de induzir a formação de anticorpos adequados quando testados em animais experimentais, ou se o fazem, tais anticorpos parecem ser inespecíficos e, portanto, inadequados para a identificação desses microrganismos.

SUMMARY

SUMMARY

Strains of cariogenic *Streptococci* were used to obtain antisera against these species in order to be useful for the identification of oral microorganisms. These antisera gave different patterns in double diffusion serological tests.

The serological reactions showed that all species studied, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* - and *S. faecalis*, were different when they were tested against the bacterial suspension antigens.

Antisera tested against homologous and heterologous species gave positive reaction with the homologous and cross-reacted with the heterologous antigens.

These results suggest that the *Streptococci* species studied do not initiate the formation of an adequate amount of antibodies when injected into rabbits, or, if they do, the antibodies have appeared to be inespecific and not suitable for classification.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, J.D. & NORD, C.E. 1973. A method of isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. Scandinavian Journal of Dental Research, 81: 163-6
- BLEIWELS, A.S.; CRAIG, R.A.; ZINNER, D.D. and JABLON, J. M. 1977. Chemical composition of purified cell walls of cariogenic streptococci. Infect Immun., 3: 189-91.
- BOWDEN, G.H.; HARDIE, J.M. & SLACK, G.L. 1975. Microbial variations in approximal dental plaque. Caries Research, 9: 253-77.
- _____ ; _____ ; MARSH, P.D.; FILLERY, E.D. & SLACK, G. L. 1976. The microflora associated with developing carious lesion of the distal surfaces on the upper first premolars in 13-14 years old children. Proceeding Microbial Aspects of Dental Caries, eds. STILES, H.M.; LOESCHE, W.J. & O'BRIEN, T.C. Special Supplement to Microbiology Abstracts , 1: 223- 41.

- BRATTHALL, D. 1969. Immunodiffusion studies on the serological specific of streptococcus resembling *S. mutans*. Reprinted from *Odontologish Revy*, 20(3):231-43.
- _____. 1970. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *Streptococcus mutans*. *Odontologish Revy*, 21: 143-52.
- _____. 1972. Immunofluorescent identification of *Streptococcus mutans*. *Odontologish Revy*, 23: 181-96.
- BURGESS, T.E. and EDWARDS, J. R. 1973. Chemical characterization of a cell wall antigen from *Streptococcus mutans* FA 1. *Infect Immun*, 8: 491-3.
- CARLSSON, J. 1965. Zooglea - forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental in man. *Odontologish Revy*, 16: 348-58.
- _____. 1967. Presence of various types of non - haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the cavity in man. *Odontologish Revy*, 18: 55-74.
- _____. 1968. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontologish Revy*, 19: 137-60.
- _____. 1970b. Nutricional requeriments for *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 4: 305-20.
- CHORPENNING, F.W.; COOPER, H.R. & ROSEN, S. 1975. Cross reactions of *Streptococcus mutans* due to cell wall teichoic

acid. *Infection and Immunity*, 12: 586-91.

CLARKE, J. K. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5: 141-7.

COLMAN, G. 1968. The application of computers to the classification of streptococci. *Journal of General Microbiology* 50: 149-58.

_____. 1969. Transformation of viridans like streptococci. *Journal of General Microbiology*, 57: 247- 55.

_____. 1970. The classification of streptococcal strains
Ph. D. Thesis, University of London.

_____. 1976. The viridans streptococci. In selected topics in clinical bacteriology, ed. De Looze, J. London : Baillière Tindall.

_____ & WILLIAMS, R.E.O. 1965. The cell walls of streptococci. *Journal of General Microbiology*, 41: 375- 87.

_____ & _____. 1967. Classification of non hemolytic streptococci. *Int. J. Syst. Bact.*, 17: 306.

_____ & _____. 1972. Taxonomy of some human viridans streptococci. In streptococci and streptococcal disease, eds Uannamaker, L. & Matsen, J.M. London & New York, Academic Press.

- COWAN, S.T. 1974. Cowan and Steels Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge: Cambridge University Press.
- COYKENDALL, A.L. 1974. Four types of *Streptococcus mutans* - based on their genetic antigenic and biochemical characteristics. *Journal of General Microbiology*, 83: 327-38.
- _____. 1977. Proposed to elevate the subspecies *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27: 26-30.
- CROUSAZ, PH.D. & GUGGNHEIM, B. 1966. Immunochemical studies on cariogenic streptococci. *Helvetica Acta Odontologica*, 10: 38-40.
- CULLEN, G. A. 1967. Classification of *Streptococcus uberis* with biochemical tests. *Research in Veterinary Science*, 8: 83-8.
- DIERNHOFER, K. 1930. *Arch. Wissnsch. u prokt. Tienheilk*, 61: 181-296.
- DODD, R. 1949. Serologic relationship between streptococcus group H and *Streptococcus sanguis*. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 70: 598-9.
- DRUCKER, D.B. & MELVILLE, T.H. 1971. The classification of same oral streptococci of human or rat origin. *Archives -*

of Oral Biology, 16: 845-53.

DRUCKER, D.B. & VEAZEY, F.J. 1977. Fatty acid fingerprints - of *Streptococcus mutans* NCTC 10832 grown at various temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 33: 221-6.

_____ ; GRIFFITH, C.J. & MELVILLE, T.H. 1976. Fatty acid fingerprints of some chemostat-grown streptococci with computerized data analysis. Microbios Letter, 1: 31-4.

EDWARDSSON, S. 1968. Characteristics of caries inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology, 13: 637-46.

_____. 1974. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. Odontologisk Revy, 25, Suppl. 32.

FACKLAM, R.R. 1974. Characteristics of *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and blood. International Journal of Systematic Bacteriology, 24: 313-9.

_____. 1977. Physiological differentiation of viridans - streptococci. Journal of Clinical Microbiology, 5: 184-201.

FULLER, A. 1938. The formamide method for the extraction of polysaccharides from hemolytic streptococci. Brit. J. exp. Path., 19: 130.

GIBBONS, R.J.; BERMAN, K.S.; KOETTNER, P. and KAPSIMALIS, B. - 1966. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic

rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Archs Oral Biol.*, 11: 549.

GLEDHILL, W.E. & CASIDA, L.E. 1969. Predominant catalase negative soil bacteria. I. Streptococcal population indigenous to soil. *Applied Microbiology*, 17 208-13.

GOLD, O.G.; JORDAN, H.V. & VAN HOUTE, J. 1975. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Archives of Oral Biology*, 20: 473-7.

GOODFELLOW, M.; COLLINS, M.D. & MINNINKIN, D.E. 1976. Thin layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organisms methanolysates of coryneform and related taxa. *Journal of General Microbiology*, 96: 351-8.

GRENIER, E.M.; EVELAND, W.C. & LOESCHE, W.J. 1973. Identification of *Streptococcus mutans* serotypes in dental plaque by fluorescent antibody techniques. *Archives of Oral Biology*, 18: 707-15.

GRUBER, M. & DURHAM, H.E. 1896. Eine neue methode zur raschen erkennung des cholera vibrio und des thyphus bacillus. *Munch. med. Wschr.*, 43: 285.

GUGGENHEIM, B. 1968. Streptococci of dental plaque. *Caries Res.*, 2: 247.

_____ and NEWBRUN, E. 1969. Extracellular glycosyl trans

ferase activity of an HS strain of *S. mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 13: 84.

GUTHOF, O. 1956. Ueber pathogene Vergrünende Streptokokken : Streptokokken-Befund bei dentogen Abszessen und Infiltraten im Bereich der Mundhöhle. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten und Hygiene Abt. I* 166: 553-64.

HAMADA, S.; MASUDA, N.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S. & KOTANI, S. - 1976. Epidemiological survey of *Streptococcus mutans* among Japanese children. *Japanese Journal of Microbiology*, 20: 33-44.

HARDIE, J.M. & BOWDEN, G.H. 1974a. The normal microbial flora of the mouth. In the normal microbial flora of man, eds. Skinner, F.A. & J.G. London & New York, Academic Press.

_____ & _____. 1974b. Cell wall and serological studies on *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 8: 301-16.

_____ & _____. 1975. Bacterial flora of dental plaque. *British Medical Bulletin*, 31: 131-6.

_____ & _____. 1976a. Physiological classification of oral viridans streptococci. *Journal of Dental Research*, 55: A166-A176.

_____ & _____. 1976b. Some serological cross-reactions between *S. mutans*, *S. sanguis* and other dental plaque strep

- tococci. *Journal of Dental Research*, 55: C50-C58.
- HARDIE, J.M. & MARSH, P.D. 1978. Streptococci and the Human Oral flora. From New book on "Streptococcus". Academ. Press, 157-205.
- _____ ; THOMSON, P.L.; SOUTH, R.J.; MARSH, P.D. BOWDEN, G.H.; McKEE, A.S.; FILLERY, E.D. & SLACK, G.L. 1977. A longitudinal epidemiological study on dental plaque and the development of dental caries- interim results after two years. *Journal of Dental Research*, 56: C90-C99.
- HARE, R. 1935. The classification of hemolytic streptococci from the nose and throat of normal human beings by means of precipitin and biochemical tests. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 41: 499-512.
- HÖFLING, J.F. 1975. Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de *Coffea arabica* L. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 45pp.
- _____. 1981. Serologia aplicada ao estudo de microrganismos de placa dentária e seu significado em relação a cárie. Piracicaba, 1981, 155p. Tese de Livre-Docência, FOP - UNICAMP.
- HORSFALL, F.L. Jr. 1951. Studies on non-haemolytic streptococci isolated from the respiratory tract of man: The antigen basis for type - specific reactions with *Streptococcus salivarius* and non-levan-forming streptococci. *J. Exp. Med.* 93: 229-45.

HUIS IN'T VELD, J.H.J. 1973. Studies on the structure of the streptococcal cell envelope, Ph D Thesis, University of Utrecht.

IACONO, V.H.; TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. and LEVINE, M.J. 1975. Isolation and immunochemical characterization of the group-specific antigen of *Streptococcus mutans* 6715. *Infect Immun.*, 11: 117-28.

IACONO, V.J.; TAUBMAN, M.; SMITH, D.J.; GARANT, P.R. & POLLOCK J.J. 1976. Structure and function of the type-specific polysaccharide of *Streptococcus mutans* 6715. In *immunologic Aspects of Dental Caries*, eds. Bowen, W.H.; Genco, R.J. & O'Brien, T.C. Washington DC & London: Information Retrieval Inc.

JABLON, J.M.; ZINNER, D.D. 1966. Differentiation of cariogenic streptococci by fluorescent antibody. *J. Bact.*, 92: 1590-6.

_____ ; FERRER, T. & ZINNER, D.D. 1976. Identification and quantitation of *Streptococcus mutans* by the fluorescent antibody technique. *Journal of Dental Research*, 55: A76-A79.

KALONAROS, I.U. & BAHN, A.N. 1965. Antigenic composition of the cell wall of *Streptococcus mitis*. *Archives of Oral Biology*, 19: 625-33.

KANTZ, W.E. & HENRY, C.A. 1974. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital

- teeth in man. Archives of Oral Biology, 19: 91-6.
- KNOX, K.W. 1970. Antigens of oral bacteria. Adv. Oral Biol., 4: 91-130.
- _____ & WICKEN, A.J. 1976. Grouping and cross-reacting antigens of oral lactic acid bacteria. Journal of Dental Research, 55: A116-A112.
- _____ ; MARKJAM, J.L. & WICKEN, A.J. 1976. Formation of cross-reacting antibodies against cellular and extracellular lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans*. BTH. Infection and Immunity, 13: 647-52.
- KOTHARI, G.C.; WILLERS, J.M.N. and MICHEL, M.F. 1971. Immunology chemistry of carbohydrate antigens of some *Streptococcus salivarius* strain. J. Gen. Microbiol., 68: 77-86.
- LANCEFIELD, R.C. 1925. The immunological relationships of *Streptococcus viridans* and certain of its chemical fractions obtained with antinucleoprotein sera. J. exp. Med., 42: 397.
- _____. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. exp. Med., 57: 571-95.
- LINZER, R. and SLADE, H.D. 1974. Purification and characterization of *Streptococcus mutans* group d cell wall polysaccharide antigen. Infect. Immun., 10: 361-8.

LINZER, R. 1976. Serotype polysaccharide antigens of *Streptococcus mutans*: composition and serological cross-reactions. In immunological aspects of dental caries, eds Bowen, W.H.; Genco, R.J. & O'Brien, T.C. Washington DC & London: Information Retrieval Inc.

_____ ; GILL, K. & SLADE, H.D. 1976. Chemical composition of *Streptococcus mutans* types c antigen: comparison to type a, b and d antigens. *Journal of Dental Research*, 55: A109-A115.

MARKHAM, J.L.; KNOX, K.W.; WICKEN, A.J. & HEWETT, J. 1975. Formation of extracellular lipoteichoic acid by oral *Streptococci* and *Lactobacilli*. *Infection and Immunity*, 12: 378-87.

MARSH, P.D.; HARDIE, J.M.; MCKEE, A.S. & BOWDEN, G.H. 1977. Specific and shared antigens within *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 11 121-2 (abstract).

MCKINNEY, R.M. & THACKER, L. 1976. Improvement in specificity of immunofluorescent reagents for identifying *Streptococcus mutans* by DEAE - cellulose - bacterial cell column immunosorption methods. *Journal of Dental Research*, 55: A50 - A57.

MEJARE, B. & EDWARDSSON, S. 1975. *Streptococcus milleri* (Guthor); an indigenous organisms of the human oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 20: 757-62.

MICHEL, M.F. and KRAUSSE, R.M. 1967. Immunochemical studies on the group F streptococci and the identification of a group-like carbohydrate in a type II strain with an undesignated group antigen. *J. Exp. Med.*, 125: 1075-90.

MINETT, F.C.; STABLEFORTH, A.W. 1931. *J. Comp. Path. and Therap.*, 44: 114.

MINNIKIN, D.E.; GOODFELLOW, M. & COLLINS, M.D. 1977. Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In *Biology of the Coryneform Bacteria*. eds Bousefield, I.J. & Callely, A.G. London & New York: Academic Press.

MIRICK, G.; THOMAS, L.; CURNEN, E. & HORSFALL, F. Jr. 1944. Studies on a non hemolytic streptococcus isolated from the respiratory tract of human beings III. Immunological relationship of *Streptococcus* MG to *Streptococcus salivarius* Type I. *Journal of Experimental Medicine*, 80: 431-40.

MONTAGUE, E.A. & KNOX, K.W. 1968. Antigenic components of the cells walls of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 54: 237-46.

MUKASA, H. and SLADE, H.D. 1973. Extration, purification and chemical and immunological properties of the *Streptococcus mutans* group a polysaccharide cell wall antigen. *Infect Immun.*, 8: 190-8.

_____ and _____, 1973. Structure and immunological spe-

cificity of the *Streptococcus mutans* group b cell wall antigen. *Infect Immun.*, 1: 578-85.

NIVEN, C.F. Jr.; SMILEY, K.L. & SHERMAN, J.M. 1941a. The production of large amounts of a polysaccharide by *Streptococcus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 41: 479-84.

_____; _____ & _____. 1941b. The polysaccharides synthesized by *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *Journal of Biological Chemistry*, 140: 105-9.

OTTENS, H. and WINKLER, K.C. 1962. Indifferent and haemolytic streptococci possessing group antigen F. *J. Gen. Microbiol.*, 28: 181-91.

OUCHTERLONY, O. 1949. Antigen - antibody reactions in gels. *Ark. Kemi. Geol.*, 266: 14.

_____. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *In: Progress in Allergy*, S. Karger, Basel, New York, 5: 1-78.

_____. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *In: Progress in Allergy*, S. Karger, Basel, New York, 6: 30-154.

PARKER, M.T. & BALL, L.C. 1976. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *Journal of Medical Microbiology*, 9: 275-302.

PERCH, B.; KJEMS, E. & RAVN, T. 1974. Biochemical and serolo

- gical properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavia (B)*, 82: 357-70.
- PORTIFIELD, J.S. 1950. Classification of the streptococci of subacute bacterial endocarditis. *J. Gen Microbiol.*, 4:92.
- QURESHI, J.V.; GOLDNER, M.; RICHE, W.H. Jr. & HARGREAVES, J.A. 1977. *Streptococcus mutans* Serotypes in young school-children. *Caries Research*, 11: 141-152.
- RANTZ, L.A. & RANDALL, E. 1955. Use of autoclaved extracts of hemolytic streptococci for serological grouping. *Stanford Medical Bulletin*, 13: 290-1.
- ROSAN, B. 1973. Antigens of *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity*, 7: 205-11.
- _____. 1976. Relationship of the cell wall composition of groups H Streptococci and *Streptococcus sanguis* to their serological properties. *Infection and Immunity*, 13: 1144-53.
- RUSSELL, R.R.B. 1976. Classification of *Streptococcus mutans* strains by SDS gel electrophoresis. *Microbios Letters*, 2: 55-9.
- SABISTON, C.B. & GOLD, W.A. 1974. Anaerobic bacteria in oral infections. *Oral Surgery*, 38: 187-93.
- SCHLOSSMAN, S.F. and KABAT, E.A. 1962. Specific fractionati-

on of a population of antidextran molecular with combining sites of various sizes. J. exp. Med., 116: 535.

SCHOTTMÜLLER, H. 1903. Die Artunterscheidung der für den Menschen pathogenen streptokokken durch Blutagar. Münchener Medizinische Wochen Schrift, 50: 849-909.

SEELEMANN, M; HADENFELDT, A. 1930. Zenth. Bakt., 1. Abt., 0 rig., 118: 331.

_____ & OBIGER, G. 1958. Über die Herstellung gruppenspezifischer Seren zur Streptokokken - Differenzierung. Z. - Hyg. Infekt. Kr., 144-504.

SELBIE, F.; SIMON, R. & ROBINSON, R. 1949. Serological classification of viridans streptococci from subacute bacterial endocarditis, teeth and throats. But. med., 116: 535.

SHERMAN, J.M. 1937. The Streptococci. Bacteriological Review., 1: 3-97.

_____ ; NIVEN, C.F. Jr. & SMILEY, K.L. 1943. *Streptococcus salivarius* and other non-hemolytic streptococci of the human throat. Journal of Bacteriology, 45: 249-63.

SHKLAIR, I.L. & KEENE, H.J. 1974. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology, 19: 1079-81.

SLADE, H.D. and SLAMP, W.C. 1972. Peptidoglycan composition

and taxonomy of group D, E and H Streptococci, and *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol., 109: 691-5.

SOCRANSKY, S.S. & MANGANIELLO, A.D. 1971. The oral microbiota of man from birth to senility. Journal of Periodontology, 42: 485-94.

_____ ; _____ ; PRODAS, D.; ORAM, V. & VAN HOUTE, J. 1977. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. Journal of Periodontal Research, 12: 90-106.

SOLOWAY, M. 1942. A serological classification of viridans - streptococci with special reference to those isolated from subacute bacterial endocarditis. J. exp. Med., 76: 109.

SOUTHWICK, F.S. & DURACK, D.T. 1974. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. III. Failure of a bacteriostatic agent (tetracycline) in prophylaxis. Journal of Clinical Pathology, 27: 261-4.

STACK, M.V.; DONOGHUE, D.H.; TYLER, J.E. & MARSHALL, M. 1973. Identification of oral streptococci with the use of standardized data from pyrolysis gas chromatography. Journal of Dental Research, 52: 969 (Abstract n^o 145).

STEWART, F.S. and Mc KEEVER, J.D. 1963. Serological definition of Lancefield Group L. J. Pathol. Bact., 85: 383-8.

THEILADE, E. & THEILADE, J. 1976. Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. Oral Sciences Reviews, 9: 23-63.

- THOMSON, L.A.; LITTLE, W. & HAGEAGE, G.J. 1976. Application of fluorescent antibody methods in the analysis of plaque samples. *Journal of Dental Research*, 55: A80-A86.
- TINANOFF, N.; GROSS, A. & BRADY, J.M. 1976. Development of plaque on enamel. Parallel investigations. *Journal of Periodontal Research*, 11: 197-209.
- TOW, H.D.Jr. & SHKLAIR, I.L. 1967. The serological relationships of certain cariogenic and potentially cariogenic streptococci. Report 67-06, Great Lakes, III: Naval Dental Research Institute.
- VAN DE RIJN, I. and BLEIWELS, A.A. 1973. Antigens of *Streptococcus mutans*. 1. Characterization of a serotype - specific determinant from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.*, 7: 795-804.
- VAN HOUTE, J.; JANSEN, H.M. & BELLACK, S. 1971. Proportions of *Streptococcus sanguis*, an organism associated with subacute bacterial endocarditis, in human faeces and dental plaque. *Infection and Immunity*, 4: 658-9.
- VAIGHT, R.M. and BLEIWEIS, A.S. 1974. Antigens of *Streptococcus mutans*. 2. Characterization of an antigen resembling a glycerol teichoic acid in walls of strain BHT. *Infect. Immun.*, 9: 60-7.
- WASHBURN, M.R.; WHITE, J.C. & NIVEN, C.F.Jr. 1946. Streptococcus S.B.E.: immunological characteristics. *Journal of Bacteriology*, 51: 723-9.

- WILLERS, J.M.N.; OTTENS, H. and MICHEL, M.F. 1964. Immunochemical relationship between *Streptococcus* MG, F111 and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 37: 425-31.
- WILLIAMS, R.E.O. 1956. *Streptococcus salivarius* (Vel hominis) and its relations to Lancefield's group K. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 72: 15-25.
- WITTGOW, W.C.Jr. & SABISTON, C.B.Jr. 1975. Micro-organisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *Journal of Endodontics*, 1: 168-71.
- ZINNER, D.D. & JABLON, J.M. 1968. Humana streptococcal strains in experimental caries. In *the Art and Science of Dental Caries Research*, ed. Harris, R.S., London & New York: Academic Press.
- _____ ; _____ ; ARAN, A.P. and SASLAW, M.S. 1965a. Experimental caries induced in animals by streptococci of human origin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 118: 766.