

ÁGUILA BERNARDES MARTINS

Farmacêutica - Bioquímica

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS BIOTIPOS DE
Streptococcus mutans EM CRIANÇAS NA REGIÃO DE
PIRACICABA, SEGUNDO O ESQUEMA DE
Shklair e Keene (1974)

Orientador: Prof. Dr. Pedro Bertolini

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Odontologia,
Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental, na
área de Microbiologia e Imunologia.

PIRACICABA - S.P.
1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

.i.

Ao meu esposo,

JOAQUIM VIDIGAL MARTINS

pela compreensão

Aos meus filhos,

JOAQUIM, DANIEL e JOANA,

pelo estímulo, dedicação

e carinho

AGRADECIMENTOS:

Aos doutores

HUGO BERNARDES DA SILVA

E

NILO BERNARDES DA SILVA

pelo apoio e incentivo no Magistério

Ao professor Dr. PEDRO BERTOLINI, responsável pela Área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, e Orientador deste trabalho, pela dedicação e segurança com que nos conduziu na execução desta pesquisa.

.iii.

Ao prof. Dr. ANTONIO CARLOS NÉDER, D.D. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela oportunidade que nos ofereceu para a realização deste trabalho, bem como à Universidade Estadual de Campinas através de seu Magnífico Reitor PLÍNIO ALVES DE MORAIS, pelo apoio dispensado aos que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

Ao prof. Dr. HÉLIO DE SOUZA, D.D. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo grande incentivo e solidariedade demonstrada.

A Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas e ao PLANO INSTITUCIONAL DE CAPACITAÇÃO DE DOCENTES (PICD), pela oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. RENATO ROBERTO BIRAL, pelas preciosas sugestões na elaboração desta tese.

A professora Dra. SONIA VIEIRA, pela amizade demonstrada e realização da análise estatística.

A senhora IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, pela revisão bibliográfica.

A colega e amiga do curso de pós-graduação, MARIA MERCEDES FERNANDES SAMPERIZ, pelo companheirismo com que me distinguiu.

Ao casal Sr. JOSÉ SOARES DE LIMA e senhora, pela hospitaleira acolhida.

A cada um, dentre todos os meus caros amigos do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, professores, colegas e funcionários, pelo saudável ambiente de trabalho e gratificante amizade.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I - INTRODUÇÃO	1
II - PROPOSIÇÕES.	7
III - MATERIAL E MÉTODOS	8
1- Seleção de pacientes.	8
2- Colheita do material de placa dental	8
3- Caracterização das colônias de <i>Streptococcus mutans</i> isoladas	9
4- Meios usados na diluição e cultura de <i>Streptococcus mutans</i>	11
4.1. Salina com extrato de levedura	11
4.2. Agar Mitis Salivarius (M.S.) adicionado de 40% de sacarose	11
4.3. Meio de Brewer (Tioglicolato) U.S.P. (oxoid).	12
4.4. Meio básico para a fermentação de carboidratos CTA("Cystina-trypticase agar", BBL).. . . .	12
4.5. Caldo para verificar a hidrólise da arginina (<i>NIVEN e cols., 1942</i>).	13
4.6. Reativo de Nessler	13
IV - RESULTADOS	14
V - DISCUSSÃO	23
VI - CONCLUSÕES	35
VII - RESUMO	37
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Sexo, CP0D e Biotipos incidentes de 40 escolares.	15
2 - Distribuição de <i>Streptococcus mutans</i> isolados de placas dentárias de 40 escolares da cidade de Piracicaba, segundo o biotipo incidente	16
3 - Distribuição dos biotipos de <i>Streptococcus mutans</i> em cultura pura ou mista isolados de placas dentárias de 40 escolares da cidade de Piracicaba.	16
4 - Distribuição do índice CP0D, segundo o biotipo de <i>Streptococcus mutans</i>	17
5 - Análise de variância dos dados apresentados na tabela 4.	18
6 - Escolares segundo o sexo e o isolamento dos biotipos.	18
7 - Escolares segundo o sexo e o biotipo e ou qualquer outro isolamento único dos biotipos de <i>Streptococcus mutans</i>	18
8 - Distribuição percentual de biotipos de <i>Streptococcus mutans</i> segundo as localidades, autores e métodos empregados.	19

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	- Gráfico de barras relativo à distribuição percentual dos 14 biotipos isolados em cultura pura ou mista segundo a localidade de Piracicaba.	20
2	- Gráfico de barras relativo à distribuição percentual dos 14 biotipos, segundo a localidade de Arábica Saudita.	21
3	- Gráfico de barras relativo à distribuição percentual do biotipo c, segundo a localidade. . . .	22
4	- Colônias de <i>Streptococcus mutans</i> em meio de Ágar Mitis Salivarius, aumento de 8x	22a
5	- Reações bioquímicas características do biotipo b de <i>Streptococcus mutans</i>	22a

I - INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Streptococcus* tem despertado o interesse de um elevado número de pesquisadores, pelos numerosos processos patológicos que determinam no homem.

Descobertos por Rivolta em 1873, receberam essa denominação por Bilroth em 1874, pelo fato de que sua morfologia é a de pequenas esferas juntas, em cadeia, à semelhança das contas de um rosário.

Em 1890, MILLER descreveu sua presença nos processos infecciosos da boca, doença periodontal e cárie. Suas relações com a cárie dentária foram demonstradas, experimentalmente, por WILLIAMS em 1897.

Segundo APPLETON (1950) "*os estreptococos, como componentes da rica variedade de bactérias encontradas na boca de adultos, tem sido incriminados nas cáries dentárias, nas infecções periapicais e periodontais e nas lesões extra-orais secundárias a focos infecciosos orais*".

A cárie dentária, a mais comum das doenças dos homens, se caracteriza por descalcificação e desintegração dos tecidos duros dos dentes, é iniciada pela desmineralização do esmalte por ácidos orgânicos que são produzidos localmente por bactérias. Além da desmineralização, as bactérias também destroem o conteúdo protéico dos dentes (espe-

cialmente da dentina). Constituindo-se, portanto, em uma doença bacteriana e como tal pode ser transmitida de um para outros membros da mesma espécie.

As bactérias que estão primariamente ligadas à decomposição dental do homem, são estreptococos anaeróbicos do gênero *Streptococcus*, espécie *mutans*. Estes microrganismos foram originalmente isolados de lesões cáries dentais por CLARKE (1924) e assemelham-se ao estreptococo cariogênico descrito por FITZGERALD & KEYES (1960). Características bioquímicas e fisiológicas, bem como, propriedades sorológicas tem sido usadas para identificar este grupo de estreptococos (BRATTHAL, 1969).

Este organismo, isolado do ser humano com cáries ativas (ZINNER e cols., 1965; GIBBONS e cols., 1966; KRASSE e cols., 1968; De STOPPELAAR e cols., 1969; LITTLETON e cols., 1970), é também considerado o agente etiológico de cárie dental em roedores (FITZGERALD & JORDAN, 1968; ZINNER & JABLON, 1968).

A potencialidade cariogênica de *Streptococcus mutans* tem merecido considerável atenção nos últimos anos. Seu relacionamento com a cárie dental nos animais de laboratório e nos homens sugere que pode ser um fator importante a considerar em investigação epidemiológicas na incidência da cárie dental em populações humanas.

Na última década foram realizados os primeiros trabalhos no sentido de se verificar a existência de sub-grupos dentre os microrganismos referidos.

Inicialmente foram preparados soros específicos (BRATTHALL, 1970) das amostras bem caracte

rizadas bioquimicamente por vários autores; posteriormente, outros métodos foram empregados e comparados, denotando algumas discordâncias entre elas com relação à classificação sorológica estabelecida.

BRATTHALL (1970) usando antissoros monoespecíficos encontrou cinco tipos sorológicos distintos para esses organismos que classificou como α , b , c , d e e . Esta classificação foi baseada em reação de precipitação obtida pela difusão em gel, na qual empregou antígenos extraídos com ácidos aquecidos, e métodos de imunofluorescência. Os primeiros quatro tipos possuíam antígenos específicos para *Streptococcus mutans*, enquanto que extratos dos tipos e reagiam também com antissoro do tipo E de LANCEFIELD (1933). O único tipo da coleção de BRATTHALL (1970) que não pode ser incluída em nenhum desses grupos foi a amostra OMZ175.

COYKENDALL (1974), dividiu *Streptococcus mutans* em quatro grupos a , b , c e d , baseando-se na composição, sequência e heterogeneidade de bases componentes dos ácidos nucleicos. Esses grupos genéticos foram correlacionados com os vários sorotipos.

GRENIER e col. (1973) usaram, para identificação de *Streptococcus mutans*, sorologia através das técnicas de imunofluorescência e métodos culturais, encontrando diferenças entre estes dois métodos.

HARDIE & BOWDEN (1974) usaram técnicas de aglutinação, empregando parede celular como antígeno para a identificação dos sorotipos de *Streptococcus mutans* da placa dental de cidadãos britânicos e iso

laram os tipos *c*, *d* e *e* mas não os tipos *a* ou *b*.

PERCH e cols. (1974) encontraram mais 2 sorotipos, o *f* e *g* que adicionaram à classificação de BRATTHALL (1970). Assim, sete tipos sorológicos existem agora designados de *a* até *g*.

Mostraram também, que além da sorologia, características culturais e bioquímicas podem ser usadas para ajudar na identificação de *Streptococcus mutans*.

Pesquisaram 210 amostras de *Streptococcus mutans* e conseguiram agrupá-las em 3 biotipos. O biotipo I incluiu 187 amostras, representando os sorotipos *a*, *c* e *f*, enquanto o biotipo II incluiu somente 4 amostras, representando o sorotipo *b*. O biotipo III consistia de 19 amostras pertencentes aos sorotipos *d*, *g* e SL-1.

Um outro método para diferenciação foi usada por SHKLAIR & KEENE (1974). A identificação foi baseada na fermentação de manitol (com e sem bacitracina), sorbitol, rafinose melibiose e na habilidade de produzir amônia da arginina. Desta maneira conseguiram separar cinco biotipos, que correlacionaram com os sorotipos reconhecidos.

ESQUEMA BIOQUÍMICO PARA A SEPARAÇÃO DOS 5 SOROTIPOS DE *Streptococcus mutans* (SHKLAIR & KEENE, 1974).

Testes Bioquímicos	S o r o t í p o s				
	a	b	c	d	e
Manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	-	+
Melibiose	+	+	+	-	-
Arginina	-	+	-	-	-
Manitol c/2 UI de bacitracina	-	+	+	+	+

Exames feitos em 194 recrutas navais que abrigavam *Streptococcus mutans*, revelaram que 189 (97,7%) eram portadores somente do biotipo c ou em combinação com outros biotipos.

OLSSON e cols. (1976) estudaram 28 amostras de estreptococos através da mobilidade eletroforética, por microtécnica. Os estreptococos de diferentes grupos mostraram diferentes potenciais. Algumas amostras pertencentes aos mesmos sorotipos de *Streptococcus mutans* apresentavam idêntica mobilidade eletroforética.

Observou que o sorotipo b possui antígeno de superfície com maior número de cargas negativas, pelo que mostrou o maior potencial de superfície.

BROWN & PATTERSON (1972) mostraram que outras diferenças podem ser usadas para distinguir os tipos, como a mobilidade eletroforética da desidrogenase do manitol-1-fosfato.

EMILSON & BRATTHALL (1976) usaram meios seletivos para diferenciar sorotipos de *Streptococcus mutans*. Observaram que o crescimento da espécie *a* é inibida no agar MSB (Mitis salivarius com bacitracina) e algumas espécies dos tipos *d* e *g* são inibidas no agar M.C. (meio de CHAPMAN).

Estudos sobre a distribuição epidemiológica desses subgrupos em populações humanas tem sido limitados por causa da dificuldade de preparar antissoros monoespecíficos.

Poucas pesquisas tem sido feitas, sobre a distribuição de variedades de *Streptococcus mutans* no mundo inteiro. Porém, muitas das amostras isoladas em diferentes laboratórios foram classificadas e refletem a ocorrência dos tipos característicos dessas regiões. Destas pesquisas, parece que onde um esforço foi feito para isolar espécies diferentes, a maioria dos sorotipos de *Streptococcus mutans* foi encontrada.

A opinião, na distribuição geográfica, é que pelo menos os tipos *c*, *d* e *e* são encontrados em todas as regiões do ocidente (BRATTHALL, 1972). Não há certeza de que os tipos *a* e *b* sejam encontrados em todos os lugares, mas as descobertas negativas podem ser uma expressão de sua baixa frequência mais do que a falta de um tipo em uma determinada região.

II - PROPOSIÇÕES

II- PROPOSIÇÕES

Sendo *Streptococcus mutans* considerado, segundo os conceitos atuais, agente etiológico da cárie dentária, classificados em grupos sorológicos a, b, c, d e e, propusemo-nos:

1. Isolar *Streptococcus mutans* de placas dentais localizadas no terço mediano das faces vestibulares de molares superiores de escolares com e sem processo de cáries.

2. Classificar bioquimicamente as amostras obtidas enquadrando-as nos vários tipos sorológicos, segundo o esquema de SHKLAIR & KEENE (1974).

3. Relacionar a presença destes biotipos de *Streptococcus mutans* com o índice de CPD e sexo dos indivíduos estudados.

4. Relacionar a distribuição geográfica dos biotipos de *Streptococcus mutans* com os resultados a serem obtidos para futuras investigações e possíveis controles epidemiológicos.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III- MATERIAL E MÉTODOS

1- SELEÇÃO DE PACIENTES

O material a ser examinado foi colhido de 40 crianças de ambos os sexos, brancas e negras, escolares, cuja idade variava de 9 a 14 anos de idade, na região de Piracicaba. Suas condições alimentares eram as da classe mediana e pobre com hábitos de higiene oral de boa a precária.

2- COLHEITA DO MATERIAL DE PLACA DENTAL

A colheita de material da placa dental foi feita usando-se uma colher de dentina, previamente confeccionada para obter-se aproximadamente 1 mg de placa. A amostra foi obtida raspando-se o terço mediano das faces vestibulares dos molares superiores dos escolares. Tomando os cuidados necessários de assepsia em todas as fases da pesquisa, o material obtido das placas dentárias era depositado em frasco pequeno, contendo pérolas de vidro e como diluente 10 ml de salina com 0,05% de extrato de levedura. A homogeneização se fazia por agitação manual durante 2 minutos aproximadamente. A seguir processava-se a diluição em série decimal, com pipetas de 1 ml até a concentração final de 10^{-7} . Alí-quotas de 0,1 ml dessa diluição eram semeadas em placas de Petri, em duplicatas, contendo o meio de cultura Mitis Salivarius ágar com 40% de sacaro-se (IKEDA & SANDHAN, 1971). Nela espalhava-se homogenicamente o material com alça de Drigaslki. A incubação em anaerobiose, era feita em jarra "Gaz-Pack".

A temperatura da estufa era ajustada a 37°C e a incubação se realizava por 48 horas. As placas foram examinadas com auxílio de microscópio estereoscópicos e aumento de 8X; as colônias com características de *Streptococcus mutans* eram transferidas para tubos contendo o meio de Brewer (tioglicolato) com pequena quantidade de carbonato de Ca (0,1 g), que servia de meio para a estocagem das colônias.

3- CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS DE *Streptococcus mutans* ISOLADAS

Inicialmente fazia-se a identificação bacterioscópica confirmando a morfologia observada no isolamento; a seguir transferia-se o material para os meios de reações bioquímicas.

Na identificação morfológica as colônias de *Streptococcus mutans* no meio M.S. (Mitis-Salivarius ágar) se mostraram finamente granulares de aspecto rugoso como pequenas mórulas, tamanho intermediário entre 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, altamente convexas com bordos irregulares. A coloração na luz refletida era cinza claro azulado e opaca. Com frequência as colônias apresentavam uma gotícula cintilante de polissacarídeo no topo; entretanto, em algumas delas, somente os primeiros caracteres foram notados, ocorrendo, às vezes, na parte central da colônia leve depressão.

Para identificação bioquímica os microrganismos foram repicados para o meio básico CTA com vermelho de fenol, adicionados dos carboidratos seguintes, na concentração final de 1%: manitol sem e

com 2 unidades/ml de bacitracina, sorbitol, rafinose, melibiose. O pH era ajustado a 7.3. Esses meios eram esterilizados na autoclave por 15 minutos, processando-se o seu resfriamento numa temperatura ambiente, para que se efetuasse a repicagem. Com alça de platina, do tubo contendo cultura em estoque (meio de Brewer) retiravam-se duas alçadas repicando-as para os tubos com CTA mais os carboidratos acima citados.

A leitura foi feita após incubação em estufa a 37°C pelo tempo de 48 a 72 horas.

Para a prova da produção de amônia a partir da arginina foi utilizada a técnica preconizada por *NIVEN e cols. (1942)*. Seguiu-se a mesma sequência de procedimentos usados nos repiques para as provas de fermentação. Após 48 horas de incubação anaeróbica a 37°C, era adicionado diretamente no meio 0,1 ml do reagente de Nessler.

O aparecimento da cor amarelo-laranja (tijolo) indicava presença de amônia na cultura.

4- MEIOS USADOS NA DILUIÇÃO E CULTURA
DE *Streptococcus mutans*

4.1. SALINA COM EXTRATO DE LEVEDURA

NaCl (Backer)..... 8,5 g
Extrato de levedura (Difco)... 0,5 g
Água destilada..... 1000 ml
pH - 7,2
Esterilizar a 121°C - 15 minutos

4.2. AGAR-MITIS SALIVARIUS (M.S.) ADI-
CIONADO DE 40% DE SACAROSE

Trypticase (BBL)..... 10,0 g
Polipeptona (BBL)..... 10,0 g
Glicose (Carlo Erba)..... 1,0 g
Sacarose (comercial)..... 400,0 g
K₂HPO₄ (Merck)..... 4,0 g
Azul Trypan (Harleco)..... 0,075 g
Cristal Violeta (Merck)..... 0,0008 g
Agar-agar (Oxoid nº 3)..... 20,0 g
Água destilada..... 1000 ml
pH - 7,2

Esterilizar a 121°C - 15 minutos, res-
friar a 50°C e adicionar uma solução de Telurito de
potássio a 1% estéril (1 ml).

Não reaquecer o meio após a adição de
Telurito. Distribuir cerca de 25 ml de meio por pla-
ca de Petri, de 9 cm de diâmetro.

4.3. MEIO DE BREWER (Tioglicolato) U.S.P. (oxoid)

Extrato de levedo (Difco)....	5,0	g
Tryptona (Difco).....	15,0	g
Dextrose (Backer).....	5,5	g
Tioglicolato de sódio (Oxoid) ..	0,5	g
Cloreto de sódio (Backer)....	2,5	g
L-Cistina (hidrocloro)....	0,5	g
Resazurina.....	0,001	g
Água destilada.....	1000	ml
pH - 7,2		

Distribuir em tubos de ensaio (150x10mm), contendo em seu interior 0,1 g de CaCO_3 . Fechar a boca do tubo com algodão e parafinar após esterilização a 121°C - 15 minutos.

4.4. MEIO BÁSICO PARA A FERMENTAÇÃO DE CARBOHIDRATOS CTA ("Cystina-tryptica- se ágar", BBL)

Cistina (Merck).....	0,5	g
Trypticase (BBL).....	20,0	g
Agar-Agar (Oxoid nº 3).....	2,5	g
Cloreto de Sódio (Backer)....	5,0	g
Sulfito de Sódio (Merck).....	0,017	g
Vermelho de Fenol.....	0,017	g
Água destilada.....	1000	ml
pH - 7,3		

Foi empregado o mesmo meio-básico, para as provas de fermentação dos seguintes carboidratos:

Manitol (Carlo Erba) com e sem Bacitracina
Rafinose (Merck)
Sorbitol (Merck)
Melibiose (Merck)

Para todos os "açúcares" a concentração final foi de 1%.

4.5. CALDO PARA VERIFICAR A HIDRÓLISE DA ARGININA (NIVEN e *Colts.*, 1942)

Extrato de levedo (Difco)....	5,0 g
Tryptona (Difco).....	5,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck).....	2,0 g
Glicose (Carlo Erba).....	0,5 g
L (+) Arginina (Merck).....	3,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH - 7,3

Dissolver os componentes, distribuir
cerca de 3 ml em tubos de 150 x 10 mm.

Esterilizar a 121⁰C por 15 minutos.

4.6. REATIVO DE NESSLER

Dissolver 50 g de KI em cerca de 35 cc
de água destilada. Adicionar, gota a gota uma solução
de HgCl₂ até que persista leve precipitado. Ajuntar
400 cc de uma solução de 50% de KOH (Dissolver
a potassa, deixar em repouso até clarear, decantar).
Completar o volume total a 1 litro com água destilada,
deixar repousar uma semana a decantar. Conservar
em vidro escuro com rolha esmerilhada (BIER, 1975).

IV - RESULTADOS

IV- RESULTADOS

Obtivemos culturas positivas para *Streptococcus mutans* da placa dental de todas as crianças examinadas.

Isolamos 52 colônias que foram submetidas as provas de identificação morfológica; classificamos o biotipo de *Streptococcus mutans* por reações bioquímicas de acordo com a orientação de *SHKLAIR & KEENE (1974)*.

Para cada escolar amostrado anotou-se o sexo, o biotipo incidente e o Índice CPD (*KLEIN & PALMER, 1937*).

Os dados coletados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sexo, CP0D e Biotipos incidentes de 40 escolares.

Nº DO ES- COLAR	SEXO	CP0D	BIOTIPOS INCIDENTES
1	M	9	c
2	M	10	c
3	M	9	cd
4	F	3	ce
5	M	7	ce
6	F	0	c
7	F	3	c
8	F	6	c
9	M	5	d
10	F	1	c
11	F	7	d
12	F	8	c
13	F	2	c
14	M	8	db
15	M	2	c
16	M	5	c
17	M	7	cd
18	M	0	c
19	M	11	d
20	M	0	c
21	M	0	cd b
22	F	0	c
23	F	3	cd
24	M	1	cd
25	F	0	c
26	F	5	b
27	F	2	c
28	F	2	d
29	M	6	c
30	M	2	c
31	F	4	cd
32	F	6	e
33	M	0	c
34	M	8	c
35	M	0	cd
36	M	0	cd
37	F	6	c
38	F	4	c
39	F	8	c
40	F	4	c

Tabela 2 - Distribuição dos biotipos de *Streptococcus mutans* isolados de placas dentárias de 40 escolares da cidade de Piracicaba, segundo o biotipo incidente.

Biotipo	Nº total	Porcentagem
a	0	0,00
b	3	5,75
c	33	63,50
d	13	25,00
e	3	5,75
Total	52	100,00 %

Tabela 3 - Distribuição dos biotipos de *Streptococcus mutans* em cultura pura ou mista isolados de placas dentárias de 40 escolares da cidade de Piracicaba.

Biotipos	Isolamento único		Biotipos	Isolamento único	
	Nº	%		Nº	%
a	0	0,0	cd	7	17,5
b	1	2,5	ce	2	5,0
c	23	57,5	cdb	1	2,5
d	4	10,0	db	1	2,5
e	1	2,5			
Total	29	72,5		11	27,5

Tabela 4 - Distribuição do índice CPOD, segundo o biotipo de *Streptococcus mutans*.

B I O T I P O S								
b	c	d	e	cd	ce	cdb	db	
5	9	5	6	9	3	0	8	
	10	7		7	7			
	0	11		3				
	3	2		1				
	6			4				
	1			0				
	8			0				
	2							
	2							
	5							
	0							
	0							
	0							
	0							
	2							
	6							
	2							
	0							
	8							
	6							
	4							
	8							
	4							
Média	5	3,74	6,25	6	3,43	5	0	8

Tabela 5 - Análise de variância dos dados apresentados na Tabela 4.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Biotipos	7	62,70	8,96	0,78
Resíduo	32	336,90	11,47	
TOTAL	39	429,60		

Tabela 6 - Escolares segundo o sexo e o isolamento dos biotipos.

Isolamento dos biotipos			
SEXO	ÚNICO	MISTO	TOTAL
M	12	8	20
F	17	3	20
TOTAL	29	11	40

Tabela 7 - Escolares segundo o sexo e o biotipo c ou qualquer outro isolamento único dos biotipos de *Streptococcus mutans*.

SEXO	Biotipos		TOTAL
	c	a, b, d ou e	
M	10	2	12
F	13	4	17
TOTAL	23	6	29

Tabela 8 - Distribuição percentual de biotipos de *Streptococcus mutans* segundo as localidades, autores e métodos empregados.

Autor	Localidade	Método	B I O T I P O S															%
			a	b	c	d	e	ac	cd	ce	de	cde	cdb	db	f	g	sp	
	G. LAGOS (E.U.A.)		0	0	87,1	1,5	0,5	1,5	5,2	3,1	0,5	0,5	0	0	0	0	0	100%
SHKLAIR e cols. (1977)	ORLANDO (E.U.A.)	Reações bioquí- micas	0	0	83,3	6,7	0	0	6,7	3,3	0	0	0	0	0	0	0	100%
	*S.DIEGO (E.U.A.)		0	0	70,8	4,2	4,2	4,2	8,3	0	0	8,3	0	0	0	0	0	100%
	*HAWAI (E.U.A.)		0	2,0	82,0	6,0	2,0	0	6,0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	100%
PERCH e cols. (1977)	DELLAWARE (E.U.A.)	Reações sorolô- gicas	0	0,4	79,7	0	9,5	0	0	0	0	0	0	0	5,6	0,4	4,4	100%
QURESHI e cols. (1977)	*TORONTO (Canadá)	Reações sorolô- gicas	0	0	93,3	2,2	4,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
	NEW YORK (E.U.A.)		0	0	92,2	5,2	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100%
SHKLAIR e cols. (1974)	ARÁBIA SAU DITA (ASIA)	Reações bioquí- micas	0	0	32,7	11,2	7,1	0	27,6	7,1	6,1	8,2	0	0	0	0	0	100%
MARTINS (1980)	*PIRACICABA (Brasil)	Reações bioquím.	0	2,5	57,5	10,0	2,5	0	17,5	5,0	0	0	2,5	2,5	0	0	0	100%

*O autor ou autores trabalharam com amostras de crianças. As demais amostras referem-se a adultos.

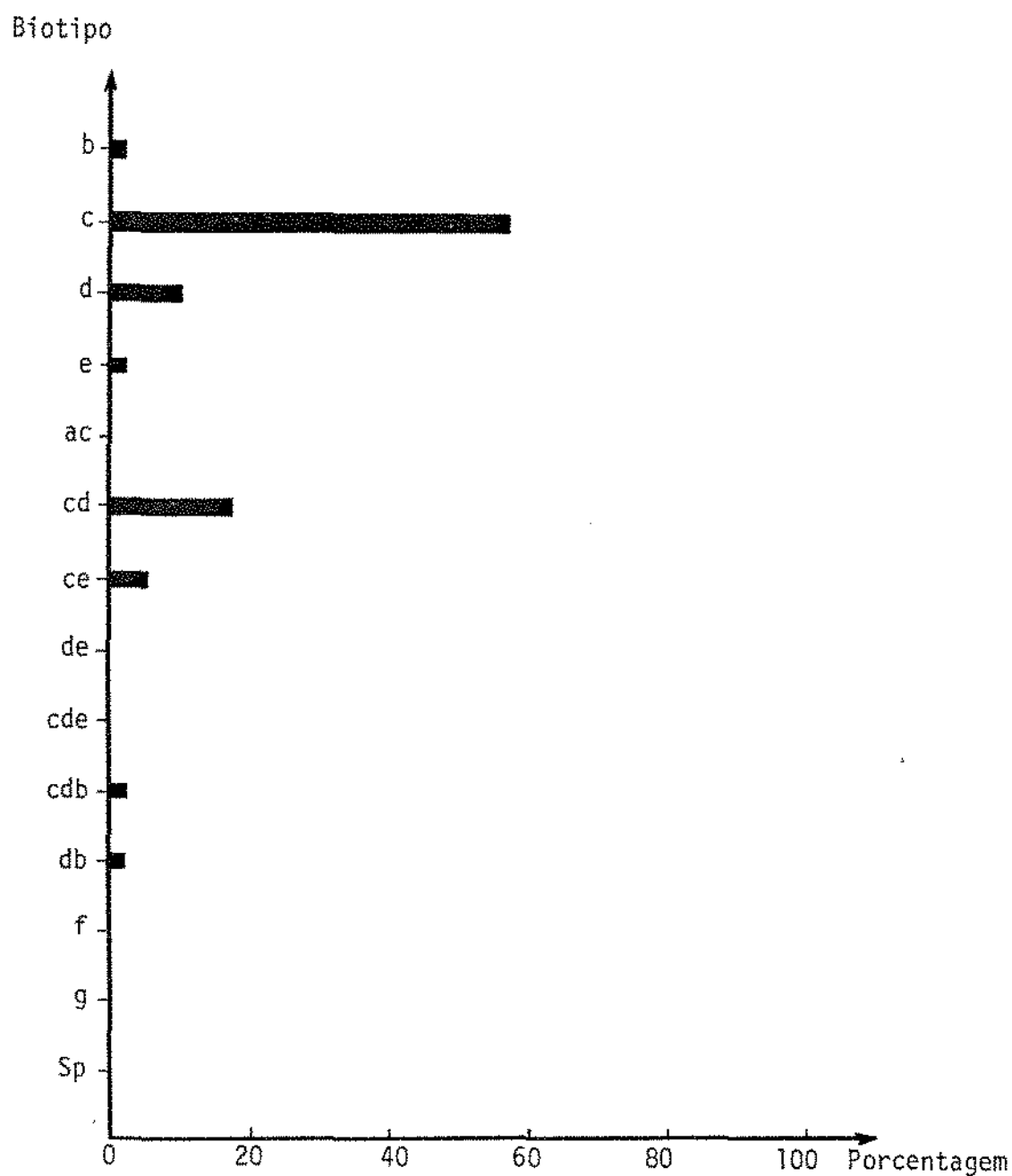


FIGURA 1 - Gráfico de barras relativo à distribuição percentual dos 14 biótipos isolados em cultura pura ou mista segundo a localidade de Piracicaba.

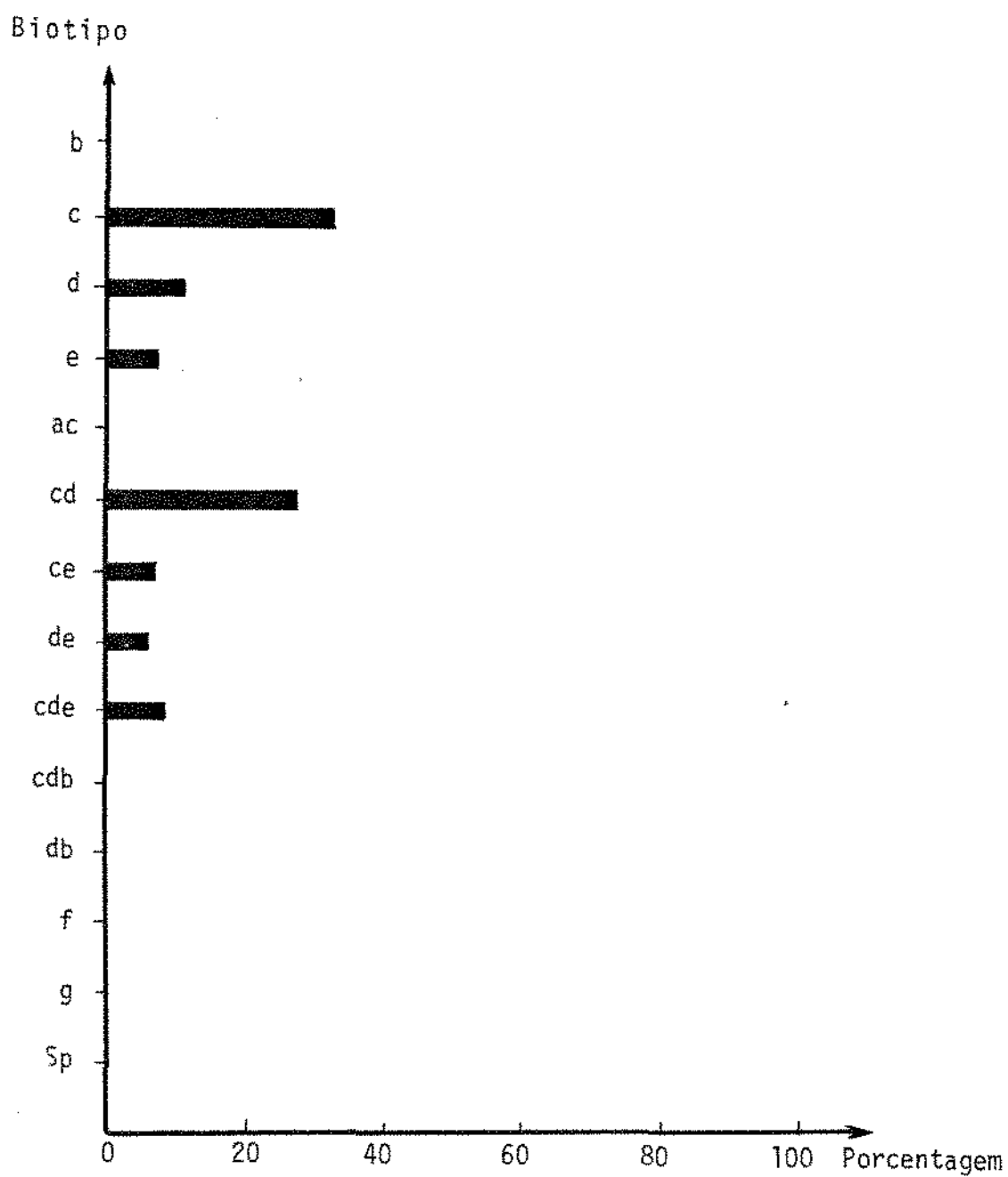


FIGURA 2 - Gráfico de barras relativo à distribuição percentual dos 14 tipos de biotipo, segundo a localidade de Arábia Saudita.

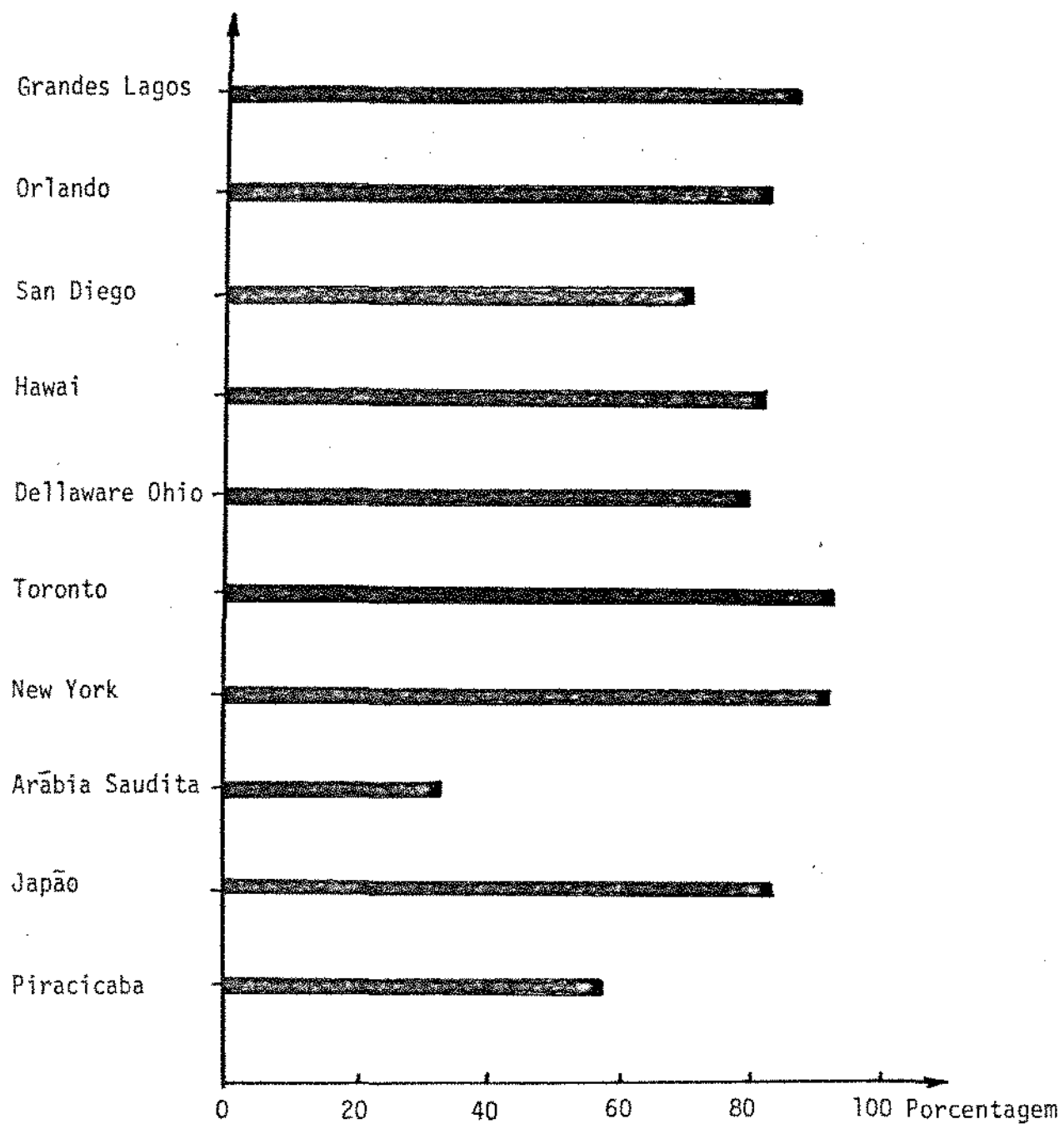


FIGURA 3 - Gráfico de barras relativo à distribuição percentual do biotipo C , segundo a localidade.

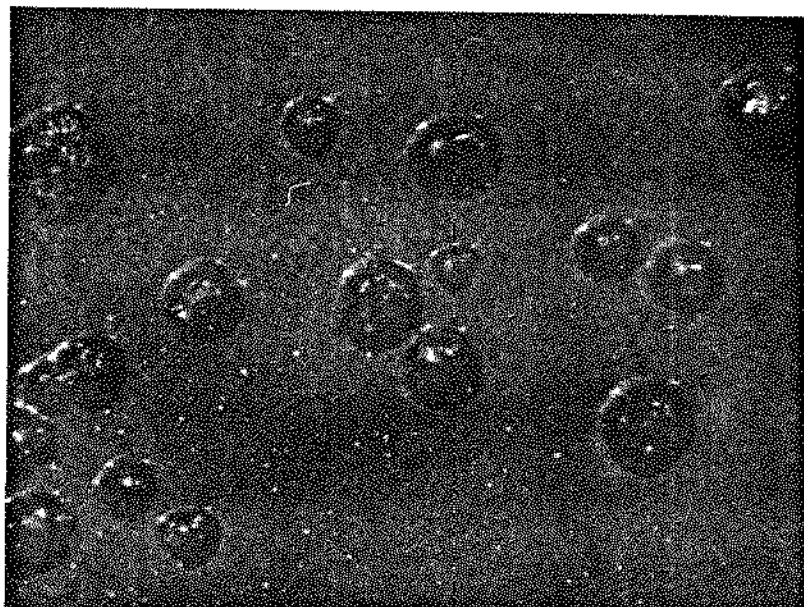


Figura 4 - Colônias de *Streptococcus mutans* em meio de Ágar Mitis Salivarius, aumento de 8x.

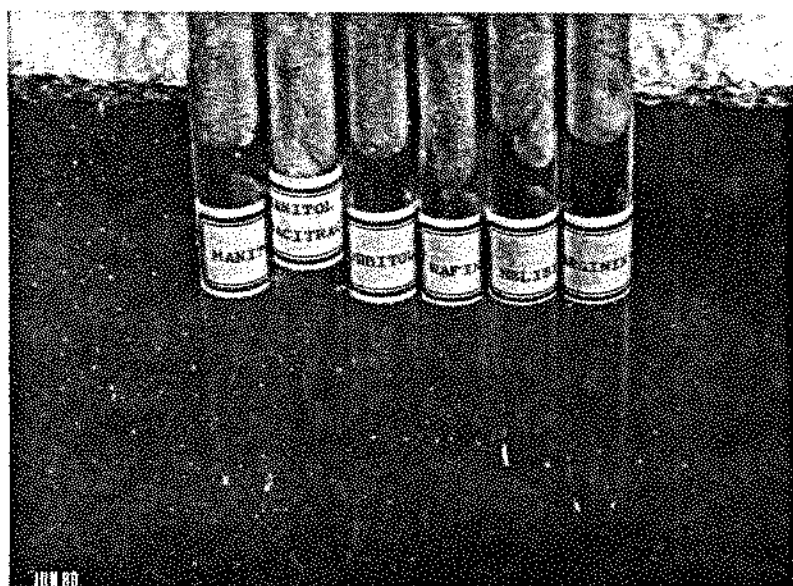


Figura 5 - Reações bioquímicas características do biotipo b de *Streptococcus mutans*.

V - DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

Desde o advento de meios de cultura altamente seletivo para *Streptococcus mutans*, tornou-se fácil determinar as quantidades aproximadas desses microrganismos nos diferentes nichos da boca. Verificou-se que o mesmo incide preferencialmente nas superfícies dos dentes, e ainda mais, que é um dos elementos que estão diretamente implicados na formação inicial da placa dentária (GUGGENHEIM, 1970).

O estudo da distribuição ecológica de *Streptococcus mutans* tem merecido a atenção de alguns pesquisadores e parece ser de significativa importância.

Nos trabalhos consultados verificamos que a coleta de material de placa pelos diversos pesquisadores foi feita através de procedimentos diversos, e geralmente, de várias superfícies dentárias. O inóculo para a semeadura em meios de cultivos seletivos, geralmente o Mitis-Salivarius ágar era quase sempre constante de uma mistura de raspados de placa.

Assim, estudando a incidência de *Streptococcus mutans* em placa dentária de 12 crianças de cor negra com 7 a 9 anos, IKEDA & SANDHAM (1971) encontraram cerca de 39% desses microrganismos em relação ao total de estreptococos, localizados nos sulcos e fissuras e 2,9% apenas, na superfície bucal e ausência total nas faces proximais.

A pesquisa de *Streptococcus mutans* em placas supragengival de 5 superfícies de molar decíduo inferior de 104 crianças com 5 anos de idade foi realizada por QURESHI e cols. (1977). Essas superfícies eram: oclusal (sulcos e fissuras) e as faces distomesiais, bucal e lingual. De um segundo grupo de crianças de 5 a 8 anos de idade colheram material das faces oclusais e proximais de um segundo molar decíduo e premolar permanente.

Amostras das regiões posteriores das faces interproximais dos 4 quadrantes, superfície oclusal posterior e também superfície posterior buco-lingual, foram colhidas por KEENE e cols. (1977) para estudo de biotipos de *Streptococcus mutans* em 5 populações humanas.

Como se pode observar, nos trabalhos citados, a coleta de material de placa foi feita em várias superfícies dentárias e uma mistura de material era semeada em meios de cultura seletivo, geralmente o Mitis-Salivarius ágar.

Na nossa pesquisa preocupamo-nos em colher material apenas do terço mediano das faces vestibulares de molares superiores, porque é um dos locais onde as crianças geralmente não escovam corretamente.

Essas superfícies examinadas não apresentavam, em nenhum caso, processo carioso, embora outras superfícies em várias oportunidades, se apresentassem cariadas ou obturadas. Dos 40 escolares examinados, fizemos coleta e semeadura de mistura de material de placas das regiões referidas, de cada um deles.

Após a incubação do material semeado, apresentando crescimento, colhíamos uma ou mais colônias características de *Streptococcus mutans* desde que as mesmas apresentassem variações morfológicas. Isolamos um total de 52 colônias (Tabela 2), sendo que foi encontrado, um ou mais dos biotipos b, c, d e e de *Streptococcus mutans* isoladamente, ou em cultura mista em todas as faces lisas dos molares examinados. Os resultados indicaram, após a identificação dos microrganismos que, nas regiões pesquisadas foi possível encontrar os biotipos correspondentes aos grupos sorológicos b, c, d e e da classificação de BRATTHALL (1970). Tais achados estão em conformidade com aqueles dos autores citados, pois também eles encontraram *Streptococcus mutans* nas diversas faces dentárias examinadas, e ainda com as observações de KEENE e cols. (1977), QURESHI e cols. (1977), GRENIER e cols. (1973) de que também os diversos tipos sorológicos podem ser encontrados nas várias faces dos dentes.

Evidentemente, essas variações de isolamento encontrada por diversos autores e por nós, dependem de uma série de fatores relativos à metodologia empregada, principalmente às condições de coleta do material, a supressão da flora de competição com seus agentes antimicrobianos, o consumo de sacarose e higiene bucal por parte dos indivíduos.

A ocorrência do microrganismo pesquisado, nas várias faces dentais, conforme os nossos resultados e dos vários autores citados, parece sugerir a importância de um ou mais locais de colonização ou implantação por parte de *Streptococcus mutans*.

Nesse sentido devemos lembrar que EDMAN e

cols. (1972) conseguiram implantar amostras de *Streptococcus mutans* em 4 faces interproximais de 2 pacientes e contaminaram estas regiões da cavidade oral durante um período de 4 a 6 semanas. Os resultados mostraram que os *Streptococcus mutans* tendiam a permanecer na região original de implantação.

Crianças com número pequeno de cáries foram comparados com outras de número elevado; os resultados parecem provar que o número de superfícies infectadas por *Streptococcus mutans* estavam estreitamente correlacionadas com atividades de cárie.

Esses estudos mostraram a importância da coleta do material na investigação da incidência de *Streptococcus mutans* em relação à cárie dental. Essas amostras de placa de superfícies dentais relacionados com os diferentes biotipos ou grupos sorológicos provavelmente possuem composição diferente.

A identificação inicial e presuntiva de *Streptococcus mutans* é feita de acordo com a morfologia que ele apresenta no meio "*Mitis-Salivarius-agar*" ou seja, colônias com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro de superfície rugosa, semelhante a pequenas mórulas.

Em 1960, FITZGERALD e *cols.*, estudando o potencial cariogênico em hamster, de estreptococos isolados de placas bacterianas de dentes desses mesmos animais, verificaram que havia diferenças bioquímicas entre eles. Os estreptococos cariogênicos eram capazes de fermentar sorbitol, o que não ocorria com os demais. As primeiras evidências para a existência de diversos tipos de *Streptococcus mutans* foram publicadas por ZINNER e *cols.* (1965), JABBLON & ZINNER (1966).

ZINNER e cols. (1965) em estudo realizado concluíram que os estreptococos cariogênicos para ratos e hamster não podiam ser incluídos nos grupos sorológicos de A até O pelo método de aglutinação ou precipitação (classificação de LANCEFIELD, 1933). Os antissoros obtidos para esses germes mostraram que eles eram imunologicamente específicos, assim como as amostras isoladas eram específicas para seus hospedeiros.

JABLON & ZINNER (1966) isolaram 8 amostras de estreptococos de lesões cariosas humanas, usando a técnica de imunofluorescência.

De material de placa dental, GUGGENHEIM (1968) isolou 86 amostras de *Streptococcus mutans* identificando-os através de 20 testes bioquímicos.

BIRAL & BERTOLINI (1970) ressaltaram a possibilidade de redução da metodologia até então usada para 2 provas fundamentais, baseadas na principal propriedade que os estreptococos indutores de cárie, possuem, que é a síntese de polissacarídeos, assim como o aspecto hipersacarosado (geleificação e precipitação pelo etanol) seguidas por outras oportunas. Os trabalhos realizados em várias partes do mundo no que tange ao isolamento e identificação do *Streptococcus mutans* da boca de animais e seres humanos são numerosos.

PERCH e cols. (1974) empregando métodos bioquímicos e sorológicos identificaram os 5 tipos sorológicos descritos por BRATTHALL (1970) acrescentando ainda os grupos f e g.

Vários autores concordaram que são numerosas as amostras de *Streptococcus mutans* que apre-

sentam características fisiológicas muito próximas.

De maneira geral as características culturais e bioquímicas tem sido usadas na identificação das variantes de *Streptococcus mutans*.

No trabalho de *PERCH e cols. (1974)* é possível verificar que autores distinguiram 3 biotipos; o biotipo I incluía amostras representando os sorotipos *a*, *c*, *e*, *f*, enquanto que o biotipo II incluía somente as amostras do sorotipo *b*. As duas principais características diferenciais era que o biotipo II era capaz de hidrolizar a arginina e cresce a 45°C. O biotipo III consistia das amostras pertencentes aos sorotipos *d*, *g* cuja atividade bioquímica é menor que os outros biotipos.

Segundo o esquema de *COYKENDALL (1974)* para a diferenciação bioquímica, o sorotipo *a* foi identificado por não crescer em presença do oxigênio, e o *b* por produzir a amônia da arginina. A fermentação lenta da frutose quando cresce em glicose é característica do sorotipo *c* e o tipo *d* não fermenta rafinose. Algumas amostras do tipo *e* foram incluídas no sorotipo *c* nesse estudo.

Mais recentemente, em 1974, *SHKLAIR & KEENE*, descreveram um pequeno grupo de reações bioquímicas para separação do *Streptococcus mutans* em 5 biotipos correspondentes aos sorotipos identificados por *BRATTHALL (1970)*. De acordo com o esquema proposto, o biotipo *b* fermenta o manitol, com e sem bacitracina na concentração de 2 UI, sorbitol, rafinose, meliobiose e produz amônia a partir de arginina; portanto dá todas as reações positivas; ao contrário do biotipo *d*, que fermenta manitol com e sem anti

biótico e o sorbitol apenas. O biotipo c, de maior incidência na placa, apenas não hidrolisa a arginina.

Empregando a mesma metodologia de *SHKLAIR & KEENE* (1974) encontramos os resultados expressos nas Tabelas 2 e 3.

Pela leitura da Tabela 2 verifica-se o isolamento de biotipos correspondentes aos grupos sorológicos b, c, d, e num total de 3 amostras (5,75%) do grupo b, 33 do grupo c (63,5%), 13 do grupo d (25,0%) e 3 do grupo e (5,75%).

Como é possível observar o tipo sorológico c foi isolado em maior número, seguido do grupo d.

A Tabela 3 mostra-nos o número e porcentagens dos biotipos correspondentes aos vários tipos sorológicos, isolados em cultura pura ou culturas mistas. Isso se tornou possível, pois de cada placa eram repicadas e identificadas ao menos 4 colônias suspeitas de serem de *Streptococcus mutans*, já que não há características coloniais próprias de cada tipo sorológico no "*Mitis-Salivarius* ágar".

De um total de 33 amostras do grupo c, obtivemos 23 (57,5%) isolamentos em culturas pura e 10 (25,0%) isolamento de placas onde cresceram também os tipos d, e, db.

O grupo d foi obtido em 4 (10,0%) isolamentos únicos e em 9 (22,5%) isolamentos mistos.

Comparando os nossos resultados com os referidos por diversos autores (*SHKLAIR & KEENE*, 1974; *QURESHI e cols.*, 1977) podemos verificar que todos eles encontraram o sorotipo c como o mais incidente,

da ordem de 70,8% para cima. Em Piracicaba foi o mesmo encontrado como prevalente, todavia, sua porcentagem situou-se em torno de 57,5%, total inferior aos demais resultados.

Por outro lado, conseguimos isolar o sorotipo *d* em 10% dos casos, o que não ocorreu na investigação de outros pesquisadores, cuja porcentagem máxima alcançada foi de 6,7%.

Com relação aos isolamentos mistos cumpre ressaltar que obtivemos a oportunidade de isolar conjuntamente os sorotipos *cdb* e *db* num total de 2,5%, para cada grupo, o que não é descrito por nenhum dos autores consultados.

Alguns trabalhos foram realizados procurando relacionar a incidência desse tipo de microrganismo com o índice CPOD, inclusive com as faces de cada dente e o estado que elas apresentam (QURESHI e cols., 1977).

Variações no potencial cariogênico dos vários tipos de *Streptococcus mutans*, tem sido observado em animais experimentais.

Com relação à possibilidade de uma situação similar para homens, os dados da literatura são insuficientes.

A correlação entre a incidência de cárie e os tipos sorológicos não tem sido estabelecida pelos vários autores.

KEENE & SHKLAIR (1977) verificaram que elevada atividade de cárie estava associada com maior isolamento do biotipo *e* de placa dental. Concluíram

ainda, que indivíduos com muitas cáries possuíam também múltiplos biotipos.

Com a finalidade de verificar se o índice CPOD é em média, o mesmo, qualquer que seja o biotipo, foi organizada a Tabela 4. Os dados apresentados nessa tabela, submetidos à análise de variância, conduziram aos métodos na Tabela 5.

A Tabela 5 mostra um valor de F com 7 e 32 graus de liberdade, igual a 0,78. Este valor não é significativo ao nível de 5%. Portanto, com base nos dados obtidos neste trabalho não se pode afirmar que existe diferença entre médias de índice CPOD obtidos de indivíduos com diferentes biotipos.

Os nossos resultados confirmam portanto os de *QURESHI e cols. (1977)* de que qualquer dos biotipos isolados ou em associação podem ser isolados das faces lisas sem cáries, pois o número de cáries é grande também em indivíduos com vários biotipos conforme nossos resultados. Contrariam as observações de *KEENE e SHKLAIR (1977)* que associaram a presença dos sorotipos e com cárie.

Não encontramos também na literatura nenhum trabalho estabelecendo relações entre os biotipos isolados de crianças ou adultos com o sexo dos mesmos. Com essa finalidade estabelecemos a Tabela 6.

A análise estatística realizada demonstrou que o teste χ^2 , com correção de continuidade, aplicado aos dados apresentados na Tabela 6, resultou em 2,01. Este valor está associado a 1 grau de liberdade e é não-significativo ao nível de 5%. Por

tanto parece razoável considerar que a proporção de escolares onde se obteve isolamento único é a mesma para ambos os sexos.

Para verificar se a proporção de escolares que apresentam o biotipo c, que é o mais comum, é a mesma entre os dois sexos, organizou-se a Tabela 7.

O teste χ^2 , com correção de continuidade, aplicados aos dados apresentados na Tabela 7, resultou em 0,00. Este valor, não significativo, permite considerar que, dentre os escolares com isolamento único, o tipo c aparece nos dois sexos na mesma proporção.

Os trabalhos realizados em várias partes do mundo são numerosos no que tange ao isolamento e identificação dos *Streptococcus mutans* da boca de animais e seres humanos. Seus resultados indicam uma diferença na incidência e na distribuição dos tipos de *Streptococcus mutans* nas diferentes populações.

Estudos sobre a prevalência de *Streptococcus mutans* em populações humanas, indicaram uma larga distribuição desse microrganismo potencialmente cariogênico e uma íntima relação com a cárie dental. Embora o significado da ocorrência dos diferentes sorotipos ou biotipos de *Streptococcus mutans* em populações humanas não seja conhecido, os estudos mostraram que há diferença na distribuição geográfica dos diferentes tipos.

Para comparar a distribuição dos biotipos obtidos neste trabalho, com a distribuição obtida por outros autores, foi organizada a Tabela 8.

Esta Tabela mostra as porcentagens de cada biotipo, segundo o autor, a localidade onde foi obtida a amostra e o método empregado para classificação.

BRATTHALL (1972) notou que os tipos *a* e *b* foram raramente isolados nas regiões por ele estudadas.

KEENE & SHKLAIR (1977) em um pequeno número de amostras de placas dentárias de indivíduos do Cairo (Egito), encontraram prevalência dos tipos *a* e *b* e pequeno número *c*. Em observações feitas na Arábia Saudita não encontraram os tipos *a* e *b*. A maior porcentagem de isolamentos foi dos biotipos *c* (32,7%) *d* (11,2%), *cd* (27,6%) e outros agrupamentos mistos em menor porcentagem.

GRENIER e cols. (1973) empregaram reação de aglutinação, usando como antígeno, parede celular para identificação de *Streptococcus mutans* de pacientes da Inglaterra e isolaram os tipos *c*, *d*, e *e* mas não *a* ou *b*.

Nas crianças de Piracicaba, usando reações bioquímicas encontramos biotipos correspondentes aos sorotipos *c* e *d* como prevalentes e ainda, em elevada percentagem, comparado com outros autores, isolamento misto dos biotipos *cd* (17,5%).

Esses resultados estão de acordo com os de *BRATTHALL (1972)* quando examinou, por técnicas de imunofluorescência material de placa dental de crianças brasileiras, material esse que lhe foi enviado. O autor identificara no mesmo, maior número dos grupos *c* e *d*.

Enquanto que os trabalhos consultados in-

dicam alta incidência do tipo c (70,8% acima) *SHKLAIR & KEENE* (1974) encontraram apenas, 32,7% na Arábia Saudita, porcentagem esta que se situa abaixo dos nossos resultados, que foram da ordem de 57,5%.

Os dados referentes ao tipo d se aproximam, pois naquela região foi encontrada a porcentagem de 11,2% e em Piracicaba de 10,0%.

Uma distribuição do percentual dos biotipos de *Streptococcus mutans*, que cresceram isolados ou conjuntamente, na mesma placa, no estudo realizado em Piracicaba é vista na Tabela 2 e Figura 1.

Pela semelhança dos resultados com aqueles obtidos na Arábia Saudita, nós os evidenciamos na Figura 2. A Figura 3 mostra-nos a incidência do biotipo c, numa distribuição segundo a localidade comparativamente aos resultados que conseguimos obter.

O número de isolamento relativamente elevado dos biotipos c e d, permite-nos sugerir que, nas pesquisas de obtenção da vacina anti-cárie deve-se levar em consideração esses resultados, procurando-se usar como antígeno, células desses biotipos de *Streptococcus mutans*, os mais prevalentes na região estudada.

VI - CONCLUSÕES

VI - CONCLUSÕES

Os resultados foram discutidos e analisados permitindo-nos as seguintes conclusões:

1. Foi possível isolar 52 amostras de *Streptococcus mutans* de material de placa dentária colhido nas faces vestibulares normais de dentes molares superiores, de todos os estudantes investigados, de idade entre 9 a 14 anos, de ambos os sexos, com índices CPOD variáveis.
2. A identificação bioquímica das amostras referidas permitiu verificar que elas pertenciam aos biotipos b, c, d, e de SHKLAIR & KEENE (1974) os quais correspondem respectivamente aos grupos sorológicos b, c, d, e proposto por BRATTHALL (1970).
3. De acordo com a análise estatística não houve diferença significativa na distribuição dos diferentes biotipos em relação ao índice CPOD e o sexo dos escolares.
4. O biotipo c, foi o mais incidente em Piracicaba, porém, em menos porcentagem (57,5%) que outras regiões do mundo (70,8% ou acima), mas em níveis su-

periores ao encontrado na Arábia Saudita (32,7%). O biotipo *d* (10,0%) teve uma incidência próxima dos resultados da Arábia (11,2), sendo que nessas 2 regiões as porcentagens foram mais elevadas que nas outras referidas. O isolamento do grupo *cd* (17,5) também se aproxima do mesmo índice encontrado na Arábia (27,6%).

VII - RESUMO

VII - RESUMO

O isolamento, identificação de biotipos de *Streptococcus mutans* e sua incidência em Piracicaba comparada com várias regiões do mundo, foram realizados no presente trabalho.

De 40 escolares, metade de cada sexo, colheu-se material de placa dentária que foi diluído e semeado em meio seletivo para o isolamento de *Streptococcus mutans*. A identificação dos mesmos foi feita através de reações bioquímicas segundo o esquema de SHKLAIR e KEENE (1974).

Os resultados obtidos, nos permitiram verificar a incidência do referido microrganismo em todas as faces vestibulares de molares superiores sem processo carioso. A identificação mostrou maior contagem de um único biotipo, e em menor incidência duas e mesmo três amostras presentes no local examinado.

O biotipo c foi encontrado em maior porcentagem, fato esse verificado por outros autores em diversas partes do mundo.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLETON, J.L.C. *Bacterial infection in dental practice*. 4a. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1950.

BIER, O. *Bacteriologia e imunologia*. 16. ed. São Paulo, Melhoramentos - Ed. U.S.P., 1975. 1056p.

BIRAL, R.R. & BERTOLINI, P. Identificação bacteriológica dos estreptococos de cárie (*Streptococcus mutans*). *Revta Bras. Odont.*, 166:291-5, 1970.

BRATTHALL, D. Demonstration of the five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odont. Revy*, 21: 143 - 52, 1970.

_____. Immunodiffusion studies on the serological specificity of streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Odont. Revy*, 20:231-44, 1969.

_____. Demonstration of *Streptococcus mutans* strains in some selected areas of the world. *Odont. Revy*, 23:401-10, 1972.

_____ & KOHLER, B. *Streptococcus mutans* serotypes some aspects of their identification, distribution, antigenic shifts and relationship of caries. *J. dent. Res.*, 55 (Spec. issue C): 15-21, 1976.

BROWN, A.C. & PATTERSON, C.E. Heterogeneity of *Streptococcus mutans* strains based on their mannitol - l. phosphate dehydrogenases: criterion for rapid classification. *Infect. Immun.*, 6:422-4, 1972.

CLARKE, J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 5:141-7, 1924.

COYKENDALL, A.L. Four types of *Streptococcus mutans* based on their genetic antigenic and biochemical characteristic. *J. gen. Microbiol.*, 83: 327-38, 1974.

EDMAN, D.C.; KEENE, H.J.; SHKLAIR, T.L.; HOERMAN, K.C. Dental floss for interproximal implantation and sampling of *Streptococcus mutans*. *IADR(73)*, 1972 (Abstract).

EMILSON, C.G. & BRATTHALL, D. Growth of *Streptococcus mutans* on various selective media. *J. Clin. Microbiol.*, 4:95-8, 1976.

FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. *Caries Res.*, 2:139-46, 1968.

_____ & KEYS, P.H. Demonstration of the etiologic role of Streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Amer. dent. Ass.*, 61:9-15, 1960.

GIBBONS, R.J.; BERMAN, K.S.; KOETTNER, P.; KAPSIMALIS, B. Dental caries and alveolar loss in gnotobiotic rats infected with capsula forming streptococci of human origin. *Archs oral Biol.*, 11:549, 1966.

GRENIER, E.M.; EVELAND, W.C.; LOESCHE, W.J. Identifi-
cation of *Streptococcus mutans* serotypes in
dental plaque by fluorescent antibody technique.
Archs oral Biol., 18:707-15, 1973.

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

_____. Extracellular polysaccharides and microbial
plaque. *Int. dent. J.*, 20:657-78, 1970.

HARDIE, J.M. & BOWDEN, G.H. Cell wall and serological
studies on *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*,
8:301-16, 1974.

IKEDA, C. & SANDHAM, H.J. Prevalence of *Streptococcus
mutans* on various tooth surfaces in negro children.
Archs oral Biol., 16:1237-40, 1971.

JABLON, J.M. & ZINNER, D.D. Differentiation of ca-
riogenic streptococci by fluorescent antibody.
J. Bacteriol., 92:1590-6, 1966.

KEENE, H.Y.; SHKLAIR, C.L.; ANDERSON, D.M.; MICKEL,
G.J. Relationship of *Streptococcus mutans* bio-
types to dental caries prevalence in Saudi Arabian
Naval Men. *J. dent. Res.*, 56:356-61, Apr. 1977.

KLEIN, H. & PALMER, C.E. Dental caries in American
Indian children. *Publ. Hlth Bull., Wash.*, 239: 1-
-41, 1937.

KRASSE, B.; JORDAN, H.V.; EDWARDSSON, S.; SVENSSON, I.; TRELL, L. The occurrence of certain "caries-inducing" Streptococci in human dental plaque material - With special reference to frequency activity of caries. *Archs oral Biol.*, 13:911-8, 1968.

LANCEFIELD, R.C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 57:571-95, 1933.

LITTLETON, N.W.; KAKCHASHI, S.; FITZGERALD, R.Y. Recovery of specific caries - inducing Streptococci from carious lesions in the teeth of children. *Archs oral Biol.*, 15:461-3, 1970.

NIVEN JR., C.F.; SMILEY, K.L.; SHERMAN, J.M. The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bact.*, 43:651-60, 1942.

OLSSON, J.; GLANTZ, P.O.; KRASE, B. Electrophoretic mobility of oral streptococci. *Archs oral Biol.*, 21:605-9, 1976.

PERCH, B.; RIJENS, E.; RAVN, C. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta path. microbiol. scand.*, 82:357-70, 1974.

QURESHI, M.G.; RICHE, W.H.; HARGREAVES, J.O. *Streptococcus mutans* serotypes in young school children. *Caries Res.*, 11:141-52, 1977.

SHKLAIR, J.L. & KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of the for varieties of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, 19:1079-81, 1974.

_____; _____; CULLEN, P. The distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of two groups of naval recruits. *Archs oral Biol.*, 19:199-200, 1974.

_____; _____; SIMONSON, L.G. Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries. Active individuals. *J. dent. Res.*, 51:88, 1972.

STOPPELAAR De, J.P. *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and dental caries. Holland, Univ. Utrecht. Dept. of Dentistry, 1969.

WILLIAMS, J.L. A contribution to the study of pathology of enamel. *Cosmos*, 39:353-74, 1897.

ZINNER, D. & JABLON, J. Human streptococcal strains in experimental caries. In: HARRIS, R.S., ed. *The art and science of dental caries research*. New York, Academic press, 1968. p.87-115.

_____; _____; HADDOX, C.H.; HARAN, P.; SASLAIV, M.S. Use of fluorescent antibody technique to identify. Experimental Hamster and Rat Strains of Cariogenic Streptococci. *J. dent. Res.*, 44: 471-5, 1965.