

MARTHA HELENA PEREIRA
Farmaceutica

SELETIVIDADE DO MEIO DE IKEDA E SANDHAN (1972) NO
ISOLAMENTO DE *Streptococcus mutans* DE PLACA DENTAL
DE CRIANÇAS DA CIDADE DE PIRACICABA

Orientador: Dr. Pedro Bertolini

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia e Patologia Buco-dental da
Faculdade de Odontologia de Piraci-
caba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Odontologia, na Área de Mi-
crobiologia e Imunologia.

PIRACICABA, SP

1 9 8 0

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

.i.

Aos meus pais,

JOÃO e CATARINA

Meus irmãos,

HÉLIO e MARIA

HUGO e NATÉRCIA

pelo amor e dedicação

Ao BERALDO, pelo grande
incentivo, com gratidão
e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao PROFESSOR, DR. PEDRO BERTOLINI, RESPONSÁVEL PELA ÁREA DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA, DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PELA DEDICAÇÃO E AMIZADE COM QUE ORIENTOU A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

.iii.

Ao meu tio, mestre e amigo
Dr. NILO BERNARDES DA SILVA
a quem tudo devo de minha
carreira universitária

Ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS NÉDER, DD. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela oportunidade da execução deste trabalho e também à Universidade Estadual de Campinas, através de seu Reitor Dr. PLÍNIO ALVES DE MORAIS.

Ao Prof. Dr. HÉLIO DE SOUZA, D.D. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo apoio e incentivo demonstrados.

À ESCOLA DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA DE ALFENAS e ao PLANO INSTITUCIONAL DE CAPACITAÇÃO DE DOCENTES (PILD) pelo apoio oferecido na realização desta pesquisa.

Ao meu tio, Dr. HUGO BERNARDES DA SILVA, pela sua contribuição através de seus estímulos e conselhos.

Ao Prof. Dr. RENATO ROBERTO BIRAL, pelas valiosas sugestões na elaboração desta tese.

À Professora Dra. SONIA VIEIRA, pela realização da análise estatística.

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

À SUELI SOLTANI e MARIA APARECIDA NALIN, pela ajuda prestada durante o decorrer do curso.

À BENEDICTA TEREZINHA MOREIRA, pelo companheirismo com que sempre me distinguiu.

. V.

Aos meus COLEGAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela amizade e carinho.

Aos CAROS AMIGOS DO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCO DENTAL, PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS, pela acolhida agradável e sadia.

À Dna. NILZE MORAIS FROTA CLEMENTE e FILHOS, pela carinhosa hospitalidade.

--ooo000||000ooo--

Í N D I C E

	<u>Página</u>
I - INTRODUÇÃO	1
II - PROPOSIÇÕES.	9
III - MATERIAIS E MÉTODOS	10
1. COLHEITA E SEMEADURA DO MATERIAL..	10
2. CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Str.</i> <i>mutans</i>	11
3. MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS	13
3.1. SALINA COM EXTRATO DE LEVE- DURA.	13
3.2. "Ágar-Mitis-Salivarius" (COM 40% DE SACAROSE OU 40% DE AÇÚCAR UNIÃO).	13
3.3. MEIO DE TIOGLICOLATO- U.S.P. (OXOID).	14
3.4. CTA-(CYSTINA-TRYPTICASE-ÁGAR BBL).	15
3.5. CALDO PARA VERIFICAR A HIDRÔ- LISE DA ARGININA(NIVEN & <u>SHER</u> <u>MAN</u> , 1942)	16
3.6. REATIVO DE NESSLER	16
IV - RESULTADOS.	17
V - DISCUSSÃO.	25
VI - CONCLUSÕES	34
VII - RESUMO	35
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
1 -	Número de colônias por placa, de acordo com os meios de cultura empregados e as condições de cultivo em microaerofilia e anaerobiose.	18
2 -	Distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> obtido quando se utiliza o meio de MS com sacarose pró-análise incubado nas condições de microaerofilia e anaerobiose.	19
3 -	Distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> obtido quando se utiliza o meio de MS com açúcar comum incubado nas condições de microaerofilia e anaerobiose.	21
4 -	Análise de variância da raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela 1.	23
5 -	Médias, usando a raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela 1 segundo as condições de incubação e os meios de cultivo.	24

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1 -	Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> quando se utiliza a sacarose pró-análise na condição de microaerofilia. . . .	20
2 -	Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> quando se utiliza sacarose pró-análise como meio de cultura na condição de anaerobiose.	20
3 -	Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> quando se utiliza como meio de cultura, o açúcar comum, obtido em condição de microaerofilia.	22
4 -	Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de <i>Str. mutans</i> quando se utiliza como meio de cultura, açúcar comum, obtido em condições de anaerobiose.	22
5 -	Colônias de <i>Str. mutans</i> crescidas em meio de "Agar-mitis-salivarius" com açúcar comum	24

I - INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

O estudo da etiologia da cárie dentária, tem despertado o interesse dos pesquisadores, em virtude de ser a mesma, altamente prevalente nos seres humanos.

A associação de *Str. mutans* com cárie dental foi pela primeira vez relatada por CLARK (1924), que isolou este microrganismo de lesões cariosas.

Mas, foi desde que FITZGERALD & KEYES (1960) demonstraram que *Str. mutans* determina cárie dental em ratos "*germ-free*", que os pesquisadores se preocuparam em formular um meio de cultura que facilitasse o isolamento desse microrganismo tornando-se possível dessa forma, a realização de levantamentos epidemiológicos em grande escala.

Uma característica importante destes germes, que parece, inclusive, estar ligada ao processo de cárie, é a sua capacidade de elaborar polissacarídeo extracelular a partir da sacarose, que possibilita a deposição de extrutura aderente a superfície dental - a placa bacteriana ou placa dental, responsável pela alteração do esmalte (FITZGERALD, 1968), ponto de partida para a degradação da dentina.

Esse material extracelular, do tipo dex-

trano e ocasionalmente levano, foi confirmado por diversos autores, (GIBBONS & BANGHARD, 1967; DAHLQVIST e col., 1967; NEUWBRUN, 1972 e MUKASA & SLARD, 1973).

O meio "*Mitis-salivarius-ágar*" (CHAPMAN, 1946), que contém substâncias inibidoras de crescimento de um grande número de microrganismos, por conter 5% de sacarose na sua composição, favorece a identificação de *Streptococcus mutans*.

Entretanto, seu uso para estudos quantitativos destes germes, torna a tarefa trabalhosa, porque colônias de outros tipos de estreptococos e mesmo de levedura nele se desenvolvem.

Por justa razão os pesquisadores procuraram elaborar um meio mais seletivo para *Str. mutans*. Utilizaram como base o próprio "*Mitis-salivarius-ágar*", introduzindo nele uma série de alterações.

Em 1967, CARLSSON, preconizou o uso de sulfadimetine (Elkosine, do Laboratório Ciba) na concentração de 0,1% baseado no fato de que 90 amostras de estreptococos diversos isolados da cavidade oral de humanos, com exceção de 5, eram resistentes aos discos de Sulfamilamida (Multodisk), colocados no meio D.S.T. ágar (Oxoid) suplementado com 7% de sangue humano.

O autor sugeriu então, o emprego do ágar base D.S.T. (Oxoid) adicionado de sacarose a 5% e dos inibidores trypan blue, cristal violeta, telurito de potássio usados em concentrações idênticas aquelas do "*Mitis-salivarius-ágar*" mais Elkosin (Ciba)

na concentração de 0,1%. Nesse meio, amostras de *Str. mutans* cresceram normalmente formando colônias com polissacarídeo extracelular havendo porém, uma redução a cerca de 5% ou mais, das outras colônias, que normalmente se desenvolvem no "*Mitis-salivarius-agar*".

Em 1970, BIRAL & BERTOLINI propuseram empregar o "*Agar-Mitis-Salivarius*" e substituir a Elkosina, por não ser mais fabricada pelo Laboratório Ciba, pelo Gantresin do Laboratório Roche, na proporção de 1%.

Os autores concluíram que:

- a) A incorporação do Gantresin ou da Elkosina (Ciba) no "*Agar-Mitis-salivarius*" o tornou seletivo para *Str. mutans*.
- b) O Gantresin (Roche) é menos seletivo que a Elkosina (Ciba).
- c) Quando se usa o D.S.T. agar (Oxoid) o efeito da sulfa é mais pronunciado.
- d) A combinação D.S.T. agar (Oxoid) mais Elkosina (Ciba), parece reduzir também o número de *Str. mutans*. Observaram que o corante de trypan blue não é de importância fundamental para a seleção de germes orais e sua omissão propícia um meio de cultura claro que favorece a observação das colônias.

Um novo meio, que permite a contagem total das colônias de bactérias, e dentre elas a de *Str. mutans* pelas características morfológicas, foi proposto por IKEDA & SANDHAN em 1972. O meio é uma modificação daquele usado por CASIDA (1965) e KRYWOLAP (1969) para enumerar bactérias do solo e da saliva. Os autores verificaram que a retirada do púrpura de bromocresol e a adição de cisteína e sangue de cavalo, ao meio, aumentava o número de microrganismos cultiváveis em cerca de 2 vezes.

Ele permite uma contagem total de bactérias comparável a que se obtém no ágar infuso de coação com sangue, sendo que a contagem de *Str. mutans* resulta em média 50% a mais do que no "*Mitis-salivarius-ágar*".

Além desses resultados favoráveis, *Str. mutans* forma no meio referido, um tipo de colônias que é facilmente distinguível das outras bactérias, apresentando-se brancas chatas com superfície brilhante, bordos lisos, com cerca de 1,5 cm de diâmetro contendo elevações dispostas como anéis concêntricos, atravessada por estrias partindo do centro da colônia.

Ainda em 1972, IKEDA & SANDHAN, propuseram para o crescimento único de *Str. mutans* a adição de 40% de sacarose ao "*Mitis-salivarius-ágar*" denominando-o M.S. 40 S.

Esta modificação baseou-se nas observações de GEHRING (1968) de que em meio contendo 40% de sacarose, 4 amostras de *Str. mutans* cresceram, en

quanto 7 amostras de vários outros tipos de estrepto-
cocos não se desenvolveram.

Interessante ressaltar que, quando culti-
vado em "*Mitis-salivarius-ágar*", algumas das amos-
tras de referência de *Str. mutans* não se apresenta-
vam com sua característica usual, sendo por vezes
chatas, cremosas e brilhantes como descrito por *JOR-*
DAN e col. (1969). Quando porém essas amostras, fo-
ram cultivadas em M.S. 40 S., puderam ser reconheci-
das, apresentando-se elevadas e grandes com 0,25 a
1 mm de diâmetro.

Outras amostras, que não as de referên-
cia de *Str. mutans* não cresciam ou formavam somen-
te colônias muito pequenas ou colônias chatas.

Esses mesmos autores isolaram 158 amostras
de estreptococos, das quais 93 foram identificadas
como *Str. mutans* por apresentarem características
bioquímicas, segundo os critérios taxonômicos esta-
belecidos por *CARLSSON (1968)*. As colônias de 67
destas amostras eram rugosas, 23 eram transparentes
e mucóides e 3 eram indistinguíveis de grupos de
Str. sanguis no meio referido.

Quando estas amostras foram cultivadas em
Ágar MS 40S, elas formaram um único tipo de colô-
nias, com aspecto rugoso.

Um total de 57 estreptococos recém-isola-
dos de material de placa dental, incluindo 24 gru-
pos de *Str. sanguis*, foram também testadas em M.S.
40 S. Somente algumas colônias de *Str. salivarius*

cresceram formando colônias minúsculas, de menos de 0,1 mm de diâmetro, ou colônias chatas que foram facilmente distinguíveis das amostras de *Str. mutans*.

No ano seguinte, GOLD e col. (1973) indicaram o uso do "*Mitis-salivarius-água*", também modificado, adicionando-lhe sacarose na proporção de 20% e bacitracina na concentração final de 0,2 U.I./ml. As quantidades ótimas de sacarose e bacitracina foram determinadas com culturas puras, considerando-se um efeito de inibição máxima dos grupos de estreptococos não caracterizados como *Str. mutans*; contrariamente, estes germes cresceram normalmente no meio indicado.

Ao nível da concentração de 20% de sacarose, *Str. sanguis* e *mitis* foram totalmente inibidos, porém o mesmo não ocorreu com *Str. salivarius*. A adição de bacitracina, em 0,2 U.I./ml de meio, foi suficiente para impedir o crescimento de *Str. salivarius* e *mitis*, porém *Str. sanguis* desenvolveu-se nessa concentração; nenhuma dessas substâncias interferia com crescimento de *Str. mutans*. A associação delas, ao "*Mitis-salivarius-água*", nas concentrações indicadas, inibe o desenvolvimento da maioria das bactérias preservando o crescimento de *Str. mutans*.

Em 1974 GOLD e col., publicaram trabalho em que indicavam o uso do "*Mitis-salivarius-água*" para a contagem de estreptococos e identificação das colônias de *Str. mutans* através do seguinte procedimento: as colônias crescidas no "*Mitis-salivarius-água*", recebem um jacto de solução de manitol a 10% sob a forma de aerosol; a seguir, a placa é incubada

.7.

da a 37°C por 3 horas após o que, recebe uma nova aspersão com solução de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio a 4% seguido de incubação por 1 hora, com subsequente leitura das colônias, que se tingem em vermelho, ou rosa escuro, pela propriedade que tem o *Str. mutans* de reduzir aquele sal. As colônias de outros tipos de estreptococos permanecem azul. O contraste de cor com as colônias que se tingem em azul é suficiente para permitir diferenciação entre *Str. mutans* e outros estreptococos. A cor rosa das colônias de *Str. mutans*, uma vez formada, é estável. Nas placas armazenadas por várias horas, ocorre uma redução lenta do TTC não específica por outros estreptococos orais, determinando uma coloração fraca das colônias, diminuindo assim o contraste entre colônias rosas e azuis.

As colônias de placas pulverizadas podem ser cultivadas até 20 horas após, para detectar células viáveis.

Mais recentemente, baseando-se na capacidade de *Str. mutans* fermentar manitol e sorbitol, LINKE (1977) elaborou um novo meio para o seu isolamento.

O autor indicou este meio contendo esses açúcares e ázida sódica para inibir o crescimento de outros microrganismos e carbonato de cálcio para neutralizar os ácidos resultantes da fermentação daqueles carboidratos.

Este meio ao contrário do "*Mitis-salivarius-ágar*" não só permite a identificação de maior

número de *Str. mutans* das amostras orais, mas também facilita a diferenciação de outros grupos de estreptococos, pois as espécies *sanguis* e *mitis* não crescem, ou crescem pouco após 10 dias de incubação.

O meio é fácil de ser preparado pois sua composição é simples e caracterizado pela presença de um indicador ácido podendo ser utilizado em condições de aerobiose e anaerobiose.

Bactérias que utilizam manitol como *Str. faecalis* e outros microrganismos como *Staphylococcus aureus* são capazes de crescer neste meio, mas podem ser distinguidos de *Str. mutans* pela sua morfologia colonial.

II - PROPOSIÇÕES

II- PROPOSIÇÕES

Considerando que o meio de *IKEDA & SANDHAN* é uma adaptação de "*Mitis-salivarius-agar*", resolvemos modificá-lo afim de torná-lo mais econômico e ao mesmo tempo verificar sua seletividade no isolamento de *Str. mutans* de placas dentais humanas.

Assim propomo-nos:

1. Verificar sua eficiência no isolamento de *Str. mutans* quando se usa sacarose pró-análise ou então, quando se a substitue por açúcar refinado comercial.
2. Quantificar *Str. mutans* nos dois meios referidos, quando incubados em condições de anaérobiose e microaerofilia.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III- MATERIAIS E MÉTODOS

1. COLHEITA E SEMEADURA DO MATERIAL

O material de placa dentária, a ser examinado, foi colhido de 40 escolares com idade de 9 a 14 anos, de ambos os sexos.

As crianças observadas, eram de classe mediana e pobre, com hábitos de higiene oral de boa a precária.

O índice C.P.O.D. era variável porém alguns indivíduos apresentavam boa saúde com ausência de cáries.

Com uma colher de dentina, estéril, confeccionada de modo a obter 1 mg de placa dental, foi feita a coleta do material, raspando-se as faces vestibulares dos molares superiores.

A seguir, o mesmo era depositado em pequenos frascos, contando pêrolas de vidro e como diluente, 10 ml de salina com 0,05% de extrato de levedura. Procedia-se a uma agitação manual por 2 minutos para homogeneização do material de placa. Logo em seguida eram feitas diluições, em série decimal, partindo-se da concentração inicial de 10^{-4} e prosseguindo-se até 10^{-7} .

.11.

Com auxílio da pipeta de Pasteur de 1cc previamente esterilizada, alíquotas de 0,1 ml de diluição 10^{-7} eram depositadas em placas de Petri, contendo os meios de cultura previamente distribuídos.

Com auxílio da alça de Drigalski, o material era adequadamente semeado nos meios a serem pesquisados; afim de evitar contaminações tinha-se o cuidado de proteger as placas com as suas respectivas tampas.

Logo após a semeadura do material, procedia-se a incubação das placas a 37°C em anaerobiose, usando-se a jarra tipo "Gaz-Pack" e em microaerofilia em dessecador, onde se colocava um pedaço de papel em chamas para consumir o oxigênio presente (BURROWS, 1963). Decorridas 48 horas eram as placas examinadas em microscópio estereoscópico com aumento de 8X.

A fim de se obter uma estocagem das colônias isoladas as mesmas eram transportadas para tubos contendo o meio de tioglicolato com pequena quantidade (0,1%) de Carbonato de Cálcio.

2. CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE *Str. mutans*

A contagem de *Streptococcus mutans* foi feita considerando-se suas características morfológicas nos meios empregados.

O tamanho das colônias variava entre 0,5 a 1 mm de diâmetro com bordos irregulares, bastante convexas e finamente granulares. Sua coloração de um cinza escuro, tendendo para o azul, era observada com auxílio de luz nelas refletidas. Era comum notar em muitas colônias um halo brilhante representado por polissacarídeo extracelular. A confirmação da espécie *mutans* foi feita através da série de reações bioquímicas conforme tabela abaixo.

ESQUEMA BIOQUÍMICO PARA A SEPARAÇÃO DOS 5 SOROTIPOS DE *Str. mutans* DE ACORDO COM SHKLAIR & KEENE (1974).

Testes bioquímicos	S o r o t i p o s				
	a	b	c	d	e
Manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	-	+
Melibiose	+	+	+	-	-
Arginina	-	+	-	-	-
Manitol c/2 Unid. de bacitracina	-	+	+	+	+

3. MEIOS DE CULTURA EMPREGADOS

3.1. SALINA COM EXTRATO DE LEVEDURA

NaCl (Backer).	8,5 g
Extrato de levedura (Difco). . .	0,5 g
Água destilada	1.000 ml
O pH era acertado para 7,2 com	
sol. de NaOH	1N

Esterilização a 121°C por 15 minutos.

A distribuição foi feita em quantidade de 10 ml em frascos contendo pérolas de vidro, para coleta e homogeneização do material de placa e em tubos de 150 X 10 mm nas quantidades de 9 ml para as diluições em série decimal.

3.2. "Ágar-Mitis-Salivarius", (COM 40% DE SACAROSE OU 40% DE AÇÚCAR UNIÃO)

Trypticase (BBL).	10,0 g
Polipeptona (BBL)	10,0 g
Glicose (Carlos Erba)	1,0 g
Sacarose (Difco).	400,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck).	4,0 g
Azul de Trypan (Harleco). . .	0,075 g
Cristal Violeta (Merck) . . .	0,0008 g
Ágar-ágar (Oxoid nº 3). . . .	20,0 g
Água destilada.	1.000 ml

.14.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos, resfriar a 50°C e adicionar uma solução de telurito de potássio de modo a obter concentração final de 1%.

Não reaquecer o meio após a adição de telurito.

Distribuir assepticamente, cerca de 25 ml do meio por placa de Petri.

3.3. MEIO DE 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
Cistina (hidroclorato)	0,5 g
Resazurina (Difco).	0,001 g
Ágar nº 2 (Oxoid nº 2)	0,5 g
Água destilada.	1.000,0 ml

O pH final se situa em torno de 7,1

Distribuir em tubos de ensaio (150 x 10 mm) contendo 0,1 g de CaCO₃ após fervura para derreter a pequena quantidade de ágar existente.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Vedar os tubos com parafina, logo após a esterilização.

3.4. CTA - (CYSTINA-TRYPTICASE-ÁGAR BBL)

Cistina (Merck).	0,5 g
Trypticase (BBL)	20,0 g
Ágar-ágar (Oxoid nº 3)	2,5 g
Cloreto de sódio (Backer). . .	5,0 g
Sulfito de sódio (Merck) . . .	0,017 g
Vermelho Fenol (Merck)	0,017 g
Água destilada.	1.000 ml

pH - 7,3

Aquecer a 100°C por 5 minutos, distribuir em porções de 3 ml, em tubos e esterilizar a 118°C por 15 minutos.

Foi empregado o meio básico acima, para as provas de fermentação dos seguintes carboidratos: manitol (Carlos Erba) sem e com 2 unidades de bacitracina.
 Rafinose (Merck)
 Sorbitol (Merck)
 Melibiose (Merck)

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

3.5. CALDO PARA VERIFICAR A HIDRÓLISE DA ARGININA (NIVEN & SHERMAN, 1942)

Extrato de levedo (Difco).	5 g
Tryptona (Difco).	5 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2 g
Glicose (Carlo Erba)	0,5 g
L (+) Arginina (Merck)	3 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 121°C durante 15 minutos.

3.6. REATIVO DE NESSLER

Dissolver 50 g de KI em cerca de 35 ml de água destilada. Adicionar, gota a gota, uma solução de HgCl₂ até que persista leve precipitado. Ajuntar 40 ml de uma solução de 50% de KOH (dissolver a potassa, deixar em repouso até clarear e decantar). Completar o volume total a 1 litro com água destilada, deixar repousar uma semana e decantar. Conservar em vidro escuro com rolha esmerilhada (BIER, 1975).

IV - RESULTADOS

IV- RESULTADOS

Foi obtido no presente trabalho, o número de colônias isoladas nos meios de cultura, sacarose pró-análise e açúcar comum, nas condições de incubação em anaerobiose e microaerofilia. Os dados apresentados na Tabela 1 se referem à média aritmética de contagem em placas semeadas em duplicata.

Os dados obtidos no meio contendo sacarose nas duas condições de cultivo, foram dispostos em uma distribuição de frequência, apresentada na Tabela 2 e em gráficos nas Figuras 1 e 2.

Os dados obtidos no meio de MS contendo açúcar nas duas condições de cultivo, foram dispostos em uma distribuição de frequência, apresentado na Tabela 3 e em gráficos nas Figuras 3 e 4.

Os dados apresentados na Tabela 1 referem-se a contagens. Então usou-se para a análise estatística, a raiz quadrada dos dados originais.

Foi feita uma análise de variância, com dois critérios de classificação, em esquema fatorial. Os resultados obtidos através dessa análise de variância estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 1 - Número de colônias por placa, de acordo com os meios de cultura empregados e as condições de cultivo em microaerofilia e anaerobiose.

Condição de incubação	Microaerofilia		Anaerobiose	
Paciente	Meio		Meio	
	c/Sacarose	c/Açúcar	c/Sacarose	c/Açúcar
1	484*	520*	732*	545*
2	850	794	550	900
3	15	12	10	21
4	132	144	120	150
5	132	54	120	60
6	24	1	58	63
7	81	65	68	61
8	34	38	31	28
9	84	80	90	95
10	36	28	38	31
11	77	0	225	80
12	107	112	127	174
13	4	5	3	0
14	72	86	108	93
15	364	363	378	432
16	491	501	505	548
17	65	3	17	12
18	55	123	120	82
19	942	731	95	813
20	0	10	35	32
21	101	164	299	163
22	0	0	0	4
23	936	984	920	1240
24	18	19	97	65
25	38	38	46	25
26	380	210	312	256
27	105	63	133	78
28	404	603	660	840
29	42	37	5	38
30	896	986	700	554
31	0	1	2	1
32	22	9	6	25
33	12	13	9	16
34	0	3	8	0
35	3	1	20	61
36	39	31	20	5
37	3	2	6	2
38	4	6	17	20
39	5	4	0	3
40	2	2	2	2

*Números de colônias X 10⁷

Tabela 2 - Distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* obtido quando se utiliza o meio de MS com sacarose prô-análise incubado nas condições de Microaerofilia e Anaerobiose.

Classe	Ponto médio de classe	Frequência		Frequência relativa	
		Microaerofilia	Anaerobiose	Microaerofilia	Anaerobiose
0 + 150	75	31	29	77,50	72,50
150 + 300	225	0	2	0,00	5,00
300 + 450	375	3	2	7,50	5,00
450 + 600	525	2	2	5,00	5,00
600 + 750	675	0	3	0,00	7,50
750 + 900	825	2	0	5,00	0,00
900 + 1050	975	2	2	5,00	5,00
TOTAL		40	40	100,00	100,00

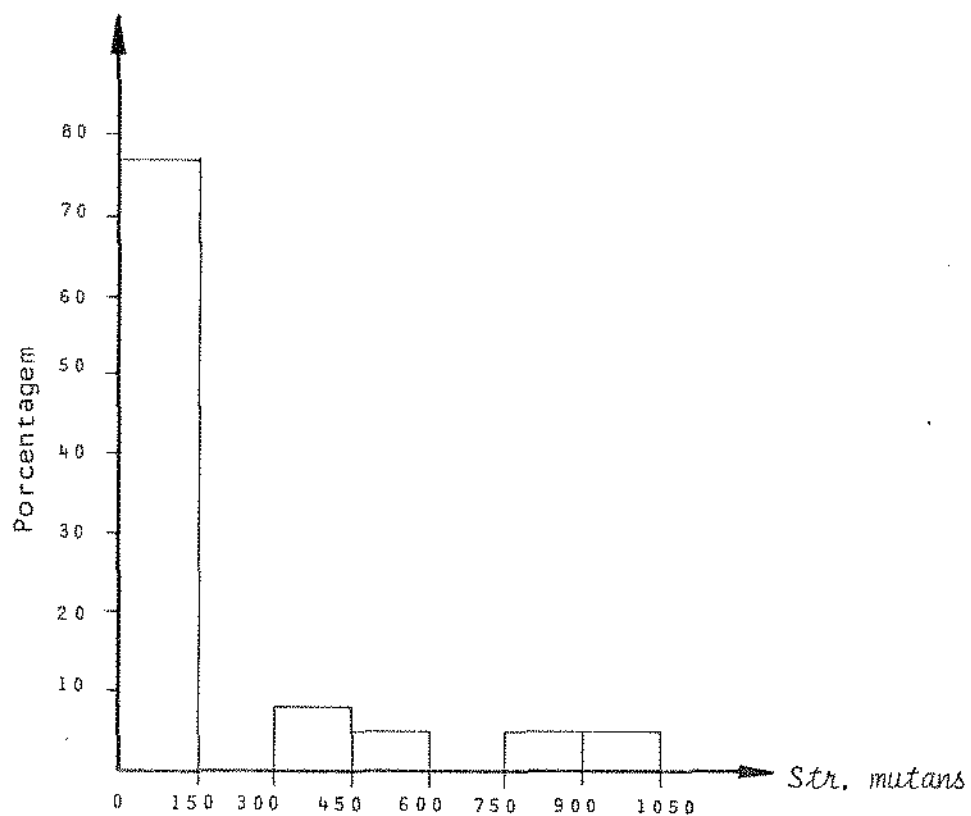


Figura 1 - Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* quando se utiliza a sacarose pró-análise na condição de microaerofilia.

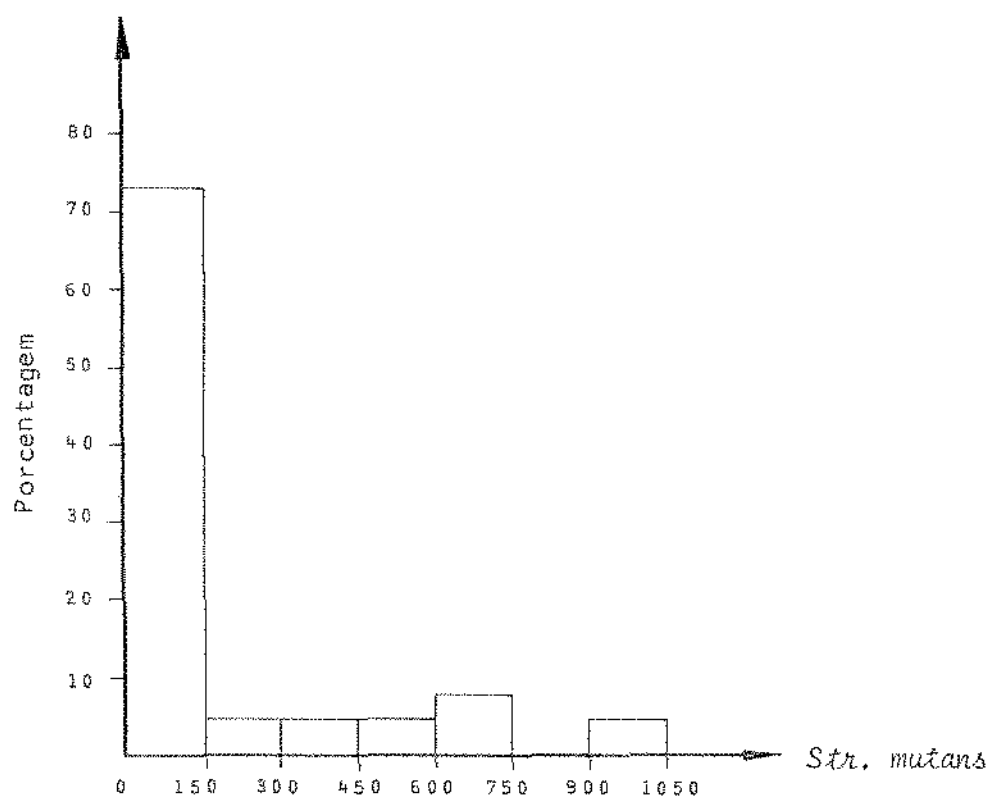


Figura 2 - Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* quando se utiliza sacarose pró-análise como meio de cultura na condição de anaerobiose.

Tabela 3 - Distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* obtido quando se utiliza o meio de MS com açúcar comum in cubado nas condições de microaerofilia e anaerobiose.

Classe	Ponto médio de classe	Frequência		Frequência relativa	
		Microaero filia	Anaero biose	Microaero filia	Anaero biose
0 + 150	75	30	28	75,00	70,00
150 + 300	225	2	4	5,00	10,00
300 + 450	375	1	1	2,50	2,50
450 + 600	525	2	3	5,00	7,50
600 + 750	675	2	0	5,00	0,00
750 + 900	825	1	2	2,50	5,00
900 + 1050	975	2	1	5,00	0,00
1050 + 1200	1125	-	0	-	2,50
1200 + 1350	1275	-	1	-	-
TOTAL		40	40	100,00	100,00

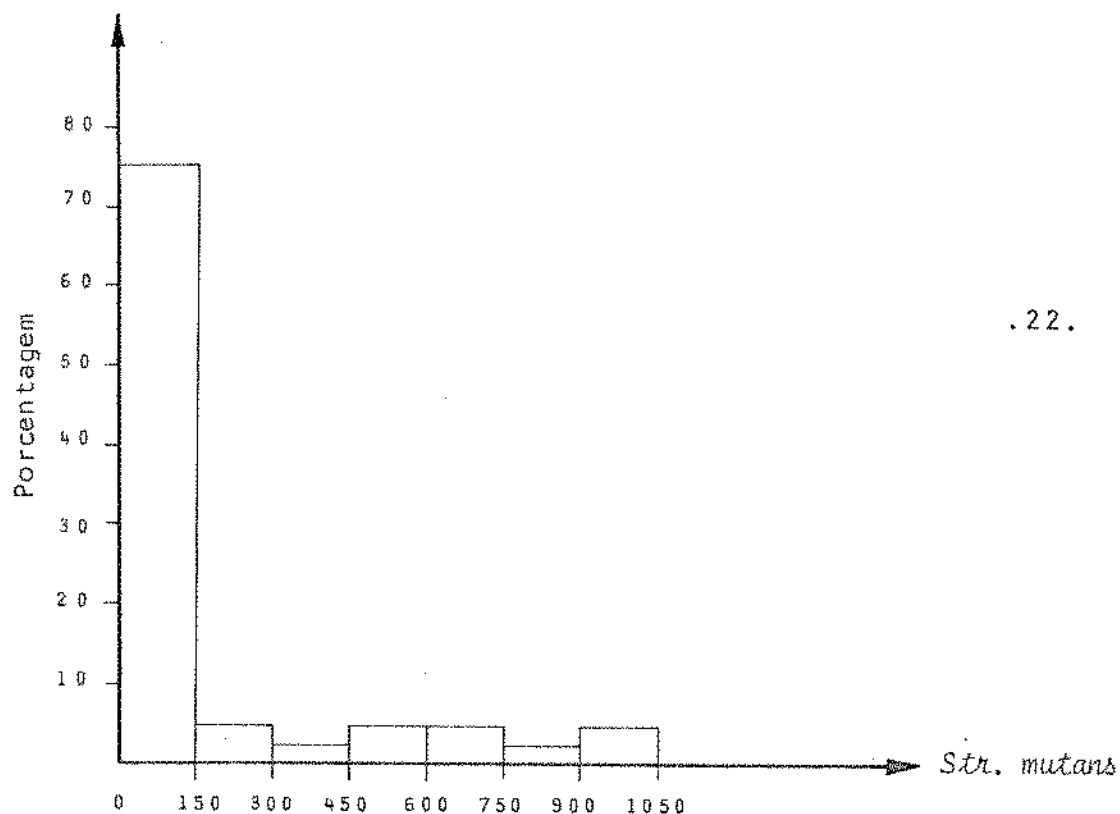


Figura 3 - Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* quando se utiliza como meio de cultura, o açúcar comum, obtido em condições de microaerofilia.

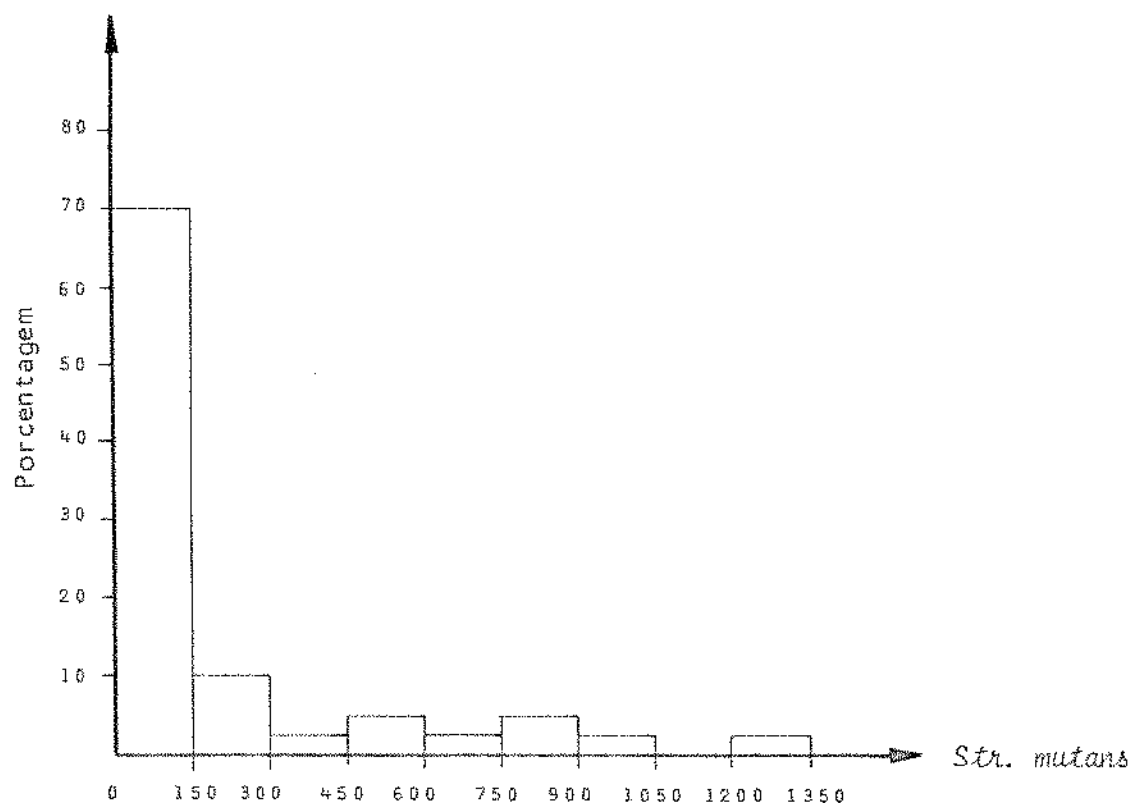


Figura 4 - Histograma relativo a distribuição de frequência do número de colônias de *Str. mutans* quando se utiliza como meio de cultura, açúcar comum obtido em condições de anaerobiose.

Tabela 4 - Análise de variância da raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela 1.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Condição de incubação	1	30,0073	30,0073	7,23**
Meio de cultivo	1	3,9503	3,9503	0,95
Interação	1	0,8318	0,8318	0,20
Tratamento	3	34,7894	-	-
Placa	39	12661,3547	334,6501	78,22**
Resíduo	117	485,5959	4,1504	
TOTAL	159	13181,7400		

Os asteriscos indicam significância no nível de 1%.

Para analisar o efeito de incubação sobre o número de colônias é interessante observar as médias da raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela 5 (segundo a condição de incubação e o meio de cultura empregados).

Tabela 5 - Médias, usando a raiz quadrada dos dados apresentados na Tabela 1 segundo as condições de incubação e os meios de cultivo.

Meio	Condição de incubação	
	Microaerofilia	Anaerobiose
Sacarose	9,76	10,48
Açúcar	9,30	10,41

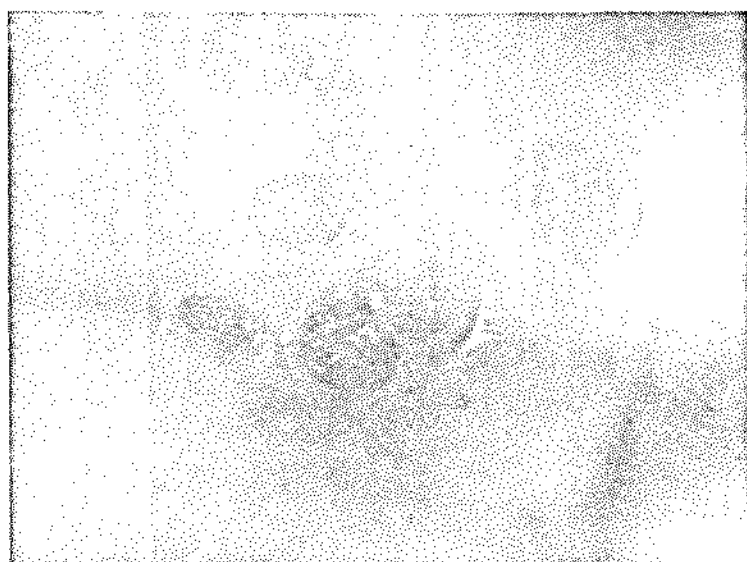


Figura 5 - Colônias de *Staph. mutans* crescidas em meio de "Ágar-nitro-salivarius" com açúcar comum envolvidas por intenso halo de polisacárido extracelular.

V - DISCUSSÃO

V- DISCUSSÃO

As experiências realizadas por *FITZGERALD* & *KEYES* (1960) e *FITZGERALD* (1963) com hamsters convencionais e ratos gnotobióticos indicaram que o processo de cárie pode ocorrer na presença de monoinfecções com bactérias do gênero *Streptococcus* espécie *mutans*.

Observações mais recentes mostraram a possibilidade de algumas amostras de estreptococos isolados de humanos determinarem cáries naqueles animais de laboratório enquanto que outras amostras são incapazes de fazê-lo (*ZINNER e col.*, 1965; *KRASSE*, 1966).

As características bioquímicas e sorológicas dos estreptococos cariogênicos para o homem são semelhantes àsquelas dos que determinam cáries em roedores.

Esses microrganismos, do homem e de roedores, sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelular, principalmente a partir da sacarose. Quando crescem em caldo sacarosado, a produção de tais polissacarídeos dá origem a massas bacterianas de consistência gelatinosa que aderem nas paredes dos frascos de cultivo. Essa ocorrência sugere que a formação desses polissacarídeos tipo dex-

trana, podem ser responsáveis pelos acúmulos de bactérias na placa dos dentes de animais inoculados com bactérias cariogênicas.

Durante os últimos 20 anos, *Str. mutans* tem despertado particular interesse nas pesquisas sobre cárie. Assim, os esforços dos investigadores se concentram no sentido de desenvolver métodos sensíveis e rápidos para identificá-lo dentre os demais componentes da flora oral.

Baseado na sua capacidade de crescimento em elevadas concentrações de sacarose foi empregado o "*Mitis-salivarius-agar*" (CHAPMAN, 1946) que dominou várias técnicas culturais. Esse meio encerra, além de peptonas, sacarose a 5% e substâncias inibidoras como o cristal violeta, trypan blue e teluriato de potássio.

A partir desse meio, várias modificações foram introduzidas no sentido de torná-lo mais seletivo. Todavia, o número e a morfologia das colônias variam de acordo com o meio empregado. As diferenças mais sensíveis nos isolamentos segundo os autores, são verificadas entre os meios com bacitracina MSB e com sulfa (M.C.).

SHKLAIR & KEENE (1974) não observaram inibição de amostras pertencentes ao sorotipo *d*, quando usavam o "*Mitis-salivarius-agar*" com sulfa. Isolaram nele, o tipo *d* sendo que 4 das mesmas eram resistentes ao sulfatiazol.

EMILSON & BRATTHALL (1976) realizaram um

estudo comparativo entre varios meios de cultura verificando que cultura pura do sorotipo *a* não crescia em MSB ("*Mitis-salivarius-agar*" com 20% de sacarose e 0,2U de bacitracina), assim como do sorotipo *d* e *g* não se desenvolviam no MC agar (meio de CARLSSON com sulfadimetine a 0,1%). No entanto, quando se tratava de culturas isoladas recentemente de placas humanas, observaram que amostras de *Str. mutants* isoladas, 9 de sorotipo *d* cresceram no MC agar.

Argumentaram ainda, com relação ao sorotipo *a*, que pelo fato de ser muito raro na Suécia nenhuma amostra do mesmo foi isolada das placas semeadas no MSB agar.

LITTLE e col. (1977), verificaram que amostras representativas do sorotipo *d* foram inibidas em meio contendo 0,1% ou 0,005% de sulfaxasol. Por outro lado, constataram que uma amostra dos sorotipos *a*, *b*, *c*, e não cresceram também em presença de sulfa.

Considerações podem ser feitas com relação a outros componentes dos meios de cultura empregados.

Os mesmos autores LITTLE e col. (1977) verificaram uma redução do número de colônias que variava em torno de 6% para o sorotipo *d* a 25% para o *b* quando o telurito de potássio era adicionado ao MS agar.

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por SYED & LOESCHE (1973), que encontraram uma

diminuição de 3 a 4 vezes o número de *Str. mutans* nessa condição.

Por outro lado GOLD e col. (1973) referem que a adição do referido sal no MS não afeta o crescimento do *Str. mutans*.

Levando em consideração essas conclusões colhidas na literatura, propuzemo-nos a realizar um levantamento da incidência de *Str. mutans* em escolares da região de Piracicaba, empregando o meio de IKEDA & SANDHAN (1972).

Esse meio é seletivo porque na sua composição a sacarose é empregada numa concentração final de 40%.

Quando são feitos isolamentos e contagens de *Str. mutans* em material de placa, grandes quantidades de meio são utilizadas, nestas condições, em 1 litro de meio devem ser usadas 400 gramas de sacarose pró-análise, o que o encarece sobremaneira. Pela facilidade de se preparar esse meio e no sentido de torná-lo menos dispendioso, resolvemos substituir a sacarose pró-análise, por açúcar comercial (açúcar União) e comparar os resultados obtidos.

Na Tabela 1 relacionamos o número de colônias de *Str. mutans* isoladas na diluição 10^{-7} no meio MS adicionado de sacarose pura ou açúcar comum, na porcentagem final de 40% e sob condições de incubação em anaerobiose e microaerofilia.

De cada placa colhiam-se algumas colônias

que apresentavam diferenças morfológicas e outras nitidamente típicas, semeando-as em tubos com caldo de tioglicolato. Fazia-se o controle de pureza pela coloração de Gram e a seguir realizavam-se as provas de fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, melibiose, manitol sem e com 2U de bacitracina e a prova de hidrólise de arginina.

De acordo com esse esquema de SHKLAIR & KEENE (1974) foi possível verificar que as amostras crescidas em ambos os tipos de meio, pertenciam aos biotipos b, c, d, e. Não foi possível detectar características morfológicas das colônias peculiares dos diversos biotipos em nenhum dos dois meios.

Alguns trabalhos mostraram que a aparente prevalência de certos biotipos pode ser influenciada pelo meio usado.

De acordo com os resultados que se obteve, o meio utilizado, tanto com sacarose como com açúcar comum permitiu isolar amostras do biotipo d, o que denota que o mesmo não é impediante para esse grupo. O sorotipo α não foi isolado de nenhuma das placas coletadas, de sorte que nada se pode afirmar com relação ao crescimento ou não do referido grupo nos meios empregados.

A análise das Tabelas 2 e 3 mostra que o maior número de placas que apresentou maior número de colônias de *Str. mutans* foi entre 0 e 150.

Deve-se ressaltar porém, conforme os resultados da Tabela 1 que a variação do número de co

lônias relativa a uma mesma placa é pequena quando se emprega o açúcar comum ou sacarose pró-análise, contudo, o seu número varia de uma placa para outra, conforme o esperado, pois uma série de fatores interferem no desenvolvimento da microbiota oral.

A distribuição é semelhante quando se considera o meio com sacarose pró-análise ou o meio com açúcar comercial incubado nas diferentes tensões de oxigênio.

Esses dados são importantes porque falam favoravelmente a substituição da sacarose pura pela comercial.

Quando se faz necessário apenas o isolamento de *Str. mutans* sem necessidade de quantificação e mesmo nos trabalhos em que há necessidade de contagens do número de colônias a modificação é ainda vantajosa pois, segundo a análise estatística, mostrou-se que as contagens são similares.

As colônias que cresceram nos dois meios eram bem parecidas e de um tipo sô, rugosas e elevadas, sendo que o halo de polissacarídeo ao redor das mesmas era mais abundante no meio com açúcar comum (Figura 5, página 24).

Essas características coloniais confirmam os resultados de *IKEDA & SANDHAN (1972)* no entanto, contrariam as observações de *LITTLE e col. (1977)*, segundo os quais a morfologia atípica observada com diversas amostras no MS 40S e MS dificultariam o reconhecimento de amostras positivas.

Um fator preponderante na formação da placa dental está representada pelas diferenças de sensibilidade ao oxigênio molecular pelas bactérias componentes da flora daquela estrutura. Os estreptococos cariogênicos, ao menos na fase de isolamento inicial, crescem melhor em ambiente de anaerobiose embora sejam anaeróbios facultativos. Assim, ARANKI e col. (1969) trabalhando com placa gengival mostraram que contagens maiores de bactérias viáveis eram obtidas com o método de anaerobiose contínua quando comparado com o emprego de jarras anaeróbicas.

Por sua vez, JORDAN e col. (1967) compararam a eficiência da técnica de Hungate (tubos em rotação) com o método das jarras, em aerobiose e anaerobiose, concluindo que melhores resultados são obtidos com a técnica de Hungate no isolamento de bactérias de amostras orais.

Essas investigações forneceram dados sobre a variabilidade de resultados conforme as técnicas de anaerobiose empregadas. Outros autores estudaram a eficiência de vários meios de cultura incubados em diferentes condições de anaerobiose, sobre o isolamento de bactérias de diferentes tipos de placa dental.

Assim, GILMOUR & POOLE (1970) verificaram o efeito estimulatório da hemina e outros nutrientes no isolamento de bactérias de placa, mas suas observações se limitaram as amostras cultivadas apenas em jarras de anaerobiose.

SYED & LOESCHE (1973) investigaram a in

fluência de vários meios de cultura, inclusive o "*Mitis-salivarius-agar*", incubados em anaerobiose pelo método convencional das jarras (colheita e semeadura do material em aerobiose e incubação em anaerobiose) e em anaerobiose pelo método de anaerobiose contínua. Como conclusão dos seus estudos ressaltaram o valor do meio de cultura MM 10 SB de CALDWELL & BRYANT (1966) para o isolamento não seletivo de bactérias de placa, bem como para contagem de *Str. mutans* e *Str. mitis*.

Recomendaram esse meio como ideal para o cultivo em anaerobiose convencional. Pelo fato de conter Dithiothreitol (DTT), componente que resiste a oxidação sob condições de aerobiose, favorece a manutenção da viabilidade bacteriana durante os procedimentos de colheita, semeadura e incubação do material de análise.

Empregando o meio MS com 40% de sacarose ou açúcar comum, procuramos verificar a influência dessas condições de cultivo. As placas após semeadura eram incubadas em duplicatas em jarras com "*Gaz-Pack*" e em jarras cujo consumo de oxigênio era feito por um pedaço de papel em chamas(BURROWS, 1963) ou seja em condições de microaerofilia.

Após o crescimento, foram feitos as contagens das colônias e a seguir, a análise estatística.

A análise da variância, apresentada na Tabela 4 mostra valores F significantes, ao nível de 1% para condição de incubação (microaerofilia e anaerobiose) e para placa. Isto significa que tanto

as condições de incubação com a placa são fatores que determinam a variação na média de número de colônias.

Portanto, segundo as condições apresentadas na Tabela 4 é fácil ver, observando-se a Tabela 5 que o número de colônias, em condições de microaerofilia é em média menor que o número de colônias em condições de anaerobiose.

Conclui-se que na quantificação de *Str. mutans* as placas semeadas devem inicialmente, ser incubadas em anaerobiose. Nas condições de microaerofilia, onde o consumo de oxigênio se faz através da queima de um pedaço de papel, o número de colônias que se desenvolvem é sempre menor. Outra observação a assinalar é a de que os tubos contendo o meio de CTA com os vários açúcares (provas da fermentação), quando incubados nas condições de microaerofilia descritas, proporcionam uma viragem do meio em 24 horas; em aerobiose essas viragens é bem mais lenta, ocorrendo de maneira visível por um período superior as 24 horas.

VI - CONCLUSÕES

VI- CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos na presente investigação, podemos concluir que:

1. *Streptococcus mutans* podem ser isolados empregando-se o meio seletivo de IKEDA & SANDHAN (1972).
2. Nesse meio, a sacarose pré-análise pode ser substituída por açúcar comercial (União) o que torna bem mais econômico.
3. Os diferentes biotipos cresceram no referido meio seletivo original e no modificado, excluindo-se o biotipo *a* que não foi isolado em nenhuma condição.
4. A incubação das placas semeadas, em jaras de anaerobiose "Gaz-Pack" proporcionou maior rendimento que em condições de microaerofilia.

VII - RESUMO

VII- RESUMO

Desde que FITZGERALD & KEYES (1960) mostraram que *Str. mutans* determinam formação de cárie em animais "germ-free" procuraram os pesquisadores formular um meio de cultura que permitisse isolar os estreptococos da boca e dentre eles *Str. mutans* especificamente.

Uma série desses meios são empregados, atualmente, com a finalidade referida. Todavia, todos eles apresentam essa característica e algumas desvantagens mais ou menos significativas, conforme o meio empregado. Em nosso trabalho optamos pelo meio com 40% de sacarose, em concentração final, substituída pelo açúcar comum.

O material foi colhido de 40 escolares cuja idade variava entre 9 a 14 anos, colhido das faces vestibulares de molares superiores, homogenizado em frascos com pérolas de vidro, contendo como diluente, salina com 0,05% de extrato de levedura; a proporção usada foi de 1 mg/ml do diluente; alíquotas de 0,1 ml da diluição 10^{-7} foram semeadas em placas contendo o meio de cultivo "*Mitis-salivarius-água*" com 40% de sacarose ou 40% de açúcar comercial.

A incubação procedeu-se em anaerobiose e microaerofilia.

Os resultados encontrados na pesquisa estão expressos em tabelas e histogramas com tratamento estatísticos que permitiram avaliar as condições experimentais pesquisadas.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANKI, A.; SYED, S.A.; KENNY, E.B.; FRETER, R.
Isolation of anaerobic bacteria from human
gingiva and mouse cecum by means of a simplified
glove box procedure. *Appl. Microbiol.*, 17:568-76,
1969.
- BIER, OTTO. *Bacteriologia e imunologia*. 16 ed.
São Paulo, Melhoramentos - Ed. U.S.P., 1975p.
797p.
- BIRAL, R.R. & BERTOLINI, P. Rendimento do "Ágar-Mi-
tis-Salivarius" adicionado de sulfa no isolamento
de estreptococos indutores de cáries dentais huma-
nas. *Revta. Farm. Odont.*, 36:140, 1970.
- BURROWS, W. *Textbook of microbiology*. 8 ed.
Philadelphia, Saunders, 1963. p.26.
- CALDWELL, D.R. & BRYANT, M.P. Medium without rumen
fluid for nonselective enumeration and isolation
of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.*, 14:794-801,
1966.
- CARLSSON, J. A medium for isolation of
Streptococcus mutans. *Archs oral Biol.*, 12:657-8,
1967.
- _____. A numerical taxonomic study of human oral
Streptococci. *Odont. Revy*, 19:137-60, 1968.

- CASIDA Jr., L.E. Abundant microorganisms in soil. *Appl. Microbiol.*, 13:327-33, 1969.
- CHAPMAN, G.H. The isolation and testing of fecal Streptococci. *Am. J. dig. Dis.*, 13:105-7, 1946.
- CLARKE, J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br. J. exp. Path.*, 5:141-7, 1924.
- DAHLQVIST, A.; KRASSE, B.; OLSSON, I.; GARDELL, S. The polymerization of dietary sugars by dental plaque. *Caries Res.*, 1:112-29, 1967.
- EMILSON, C.G. & BRATHALL, D. Growth of *Streptococcus mutans* on various selective media. *J. Clin. Microbiol.*, 4:95-8, 1976.
- FITZGERALD, R.J. Gnotobiotic contribution to oral microbiology. *J. dent. Res.*, 42:549-52, 1963.
- _____. Plaque microbiology and caries. *Alabama. J. med. Sci.*, 5:239-46, 1968.
- _____. & KEYES, P.H. Demonstration of the etiology role of Streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. dent. Ass.*, 61:9-15, 1960.
- GEHRING, G. Über das wachstum einiger zahnplaque streptokokken auf feacter und in flüssiger nahrungsmitteln mit verschiedenen zuckerkonzentrationen. *Dt. zahnärztl. z.*, 23:914-23, 1968.

GIBBONS, R.J. & BANGHART, S.B. Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Archs. oral Biol.*, 12:11-24, 1967.

GILMOUR, M.N. & POOLE, A.E. Growth stimulation of the mixed microbiol. flora of human dental plaques by hemin. *Archs oral Biol.*, 15:1343-1353, 1970.

GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Str. mutans*. *Archs oral Biol.*, 18:1357-64, 1973.

_____; _____; _____. Identification of *Str. mutans* colonies by mannitol-dependent tetrazolium reduction. *Archs oral Biol.*, 19:271-2, 1974.

IKEDA, T. & SANDHAM, H.J. A high sucrose medium for the identification of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, 18:1357-64, 1972.

_____ & _____. A medium for the recognition and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, 17:601-4, 1972.

JORDAN, H.V.; ENGLANDER, H.R.; LENI, S. Potentially cariogenic Streptococci in selected population groups in the western hemisphere. *J. Am. dent. Ass.*, 78:1331-5, 1969.

JORDAN, H.V.; KRASSE, B.; MOLLER, A. A method of sampling human plaque material for caries inducing Streptococci. *IADR*: 70, 1967. (Abstrat)

KRASSE, B. Human Streptococci and experimental caries in hamster. *Archs oral Biol.*, 11:429-36, 1966.

KRYWOLAP, G.N. Enumeration of abundant oral microorganism. *IADR*: 180, 1969. (Abstrat)

LINKE, H.A.B. New medium for the isolation of *Streptococcus mutans* and its differentiation from other oral Streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 5:604-9, June, 1977.

LITTLE, W.A.; KARTS, D.C.; THOMSON, L.A.; BOWEN, W.H. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on ten isolation media. *J. Clin. Microbiol.*, 5:578-83. June 1977.

MUKASA, A. & SLARD, H.D. Mechanism of *Str. mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran levan synthase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.*, 8:555-62, 1973.

NEWBRUN, E. Extracellular polysacharides by glucosyltransferases of oral Streptococci composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, 6:132-47, 1972.

- SHKLAIR, I.L. & KEENE, H.J. A biochemical sheme for the separation of the varieties of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, 19:1079-81, 1974.
- SYED, S.A. & LOESCHE, W.J. Efficiency of various growth media in recovering oral bacterial flora human dental plaque. *Appl. Microbiol.*, 26:459-65, 1973.
- ZINNER, D.D.; JABLON, J.M.; ORAN, A.P.; SASLAW, M.S. Experimental caries induced in animals by Streptococci of human origen. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 118:766-70, 1975.