

RENATO ROBERTO BIRAL

Cirurgião Dentista

ESTREPTOCOCOS DE PLACAS DENTAIS HUMANAS
E SEU SIGNIFICADO EM RELAÇÃO À CÁRIE

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Microbiologia)

PIRACICABA - S.P.

1968

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

A. meus pais

A minha espôsa e meus filhos

Ao Prof. Dr. Carlos Solé-Vernin, nosso orientador, a gratidão pelos bons conselhos, incentivo e orientação segura.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade de Campinas, alto dignitário dos anseios daqueles que se iniciam nessa excelente organização de ensino e pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Robertson Liberalli, Ex-Diretor desta casa de ensino, que nos proporcionou inestimável amparo.

Ao Dr. Plínio Alves de Moraes, professor responsável - pela Cadeira de Microbiologia, nossa homenagem de gratidão pelo apoio e estímulo.

Ao Dr. Pedro Bertolini, com quem o simples convívio é um estímulo à pesquisa, pelas criteriosas sugestões.

Ao Dr. Andrés José Tumang, que tão atenciosamente nos auxiliou em traduções do inglês, pelo incentivo e oportunas sugestões.

Aos Drs. Doran D. Zinner (University of Miami, Florida, U.S.A.); Bo Krasse e Jon Carlsson (University of Lund, School of Dentistry, Malmö, Sweden); Ronald J. Gibbons (Forsyth Dental Infirmary and Harvard School of Dental Medicine, Boston, Massachusetts); R.J. Fitzgerald e Paul Keyes (National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), nossos correspondentes, que nos forneceram culturas-padrão, separatas e informações especiais.

Ao acadêmico Cláudio Mendes de Campos que nos auxiliou de modo marcante em algumas fases da pesquisa.

ÍNDICE

MATERIAL ILUSTRATIVO	Pag.
1. Figuras.....	7
2. Quadros.....	8
Capítulo 1	
INTRODUÇÃO	
1.1 - A importância do problema da cárie dental....	9
1.2 - Revisão da literatura sobre bacteriologia da cárie dental com especial referência aos estreptococos.....	10
1.3 - Proposições da pesquisa.....	33
Capítulo 2	
MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 - Normas para a seleção dos pacientes.....	35
2.2 - Colheita e pesagem dos raspados dentais.....	36
2.3 - Meios de cultura.....	37
2.4 - Contagem de colônias, isolamento e conservação dos estreptococos.....	42
2.5 - Normas para a identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON.....	43
2.6 - Descrição das provas de identificação.....	46
2.7 - Ensaio prévio dos meios de cultura e das provas de identificação.....	48
Capítulo 3	
RESULTADOS	
3.1 - Descrição dos tipos de colônias.....	49
3.2 - Comentários aos resultados em si próprios....	53
3.3 - Identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON.....	58
Capítulo 4	
DISCUSSÃO	
4.1 - A flora da boca.....	65
4.2 - Dextrana e sacarose.....	66
4.3 - Inquérito sobre a causalidade, a patogenidade e o saprofitismo, com vista às amostras de estreptococos isoladas de locais em que se produziu cárie.....	69
4.4 - Lactobacilos e cárie dental.....	76
4.5 - Prevenção da cárie.....	76
Capítulo 5	
CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
APÊNDICE (Fichas da casuística).....	89

MATERIAL ILUSTRATIVO

I. Índices das Figuras

	Pág.
Figura 1 A complexa etiologia da cárie dental: fatores essenciais determinantes.....	21
Figura 2 Colônias de estreptococos do Grupo I (<u>Str. sanguis</u>), cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 36 horas a 37°C. Aumento de 42 - diâmetros.....	50
Figura 3 Colônias de estreptococos do Grupo II (<u>Str. mutans</u>), cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 24 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros.....	52
Figura 4 Colônias de estreptococos do Grupo III (<u>Str. salivarius</u>), cultivada em ágar "Mitis-salivarius" por 48 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros.....	54
Figura 5 Colônias de estreptococos do Grupo IV (<u>Str. sp.</u>), cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 24 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros.....	55
Figura 6 Colônias de estreptococos do Grupo V (<u>Str. mitis</u>, etc.), cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 36 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros.....	55
Figura 7 Fatores essenciais de cárie. Adaptado de KEYES (1962) com a inclusão de um quarto fator (prazo de tempo).....	76

2. Índice dos Quadros

Pág.

Quadro 1

Legenda geral para os Quadros.....

60

Quadro 2

Critérios taxonômicos na classificação de estreptococos nos Grupos de CARLSSON.....

61

Quadro 3

Distribuição da frequência, nos Grupos de CARLSSON, de 81 amostras de estreptococos isoladas de 27 placas dentais.....

62

Quadro 4

Enquadramento, nos Grupos de CARLSSON, das 81 amostras de estreptococos isoladas de 27 placas dentais de 12 pacientes, segundo - comportamento nas provas de identificação bacteriológica.....

63

Quadro 5

Distribuição da frequência dos Grupos de estreptococos de CARLSSON com contagem de suas unidades viáveis, em 27 placas dentais de 12 pacientes; índice CPO-S na ocasião; e exame clínico desses locais 6 meses após o exame bacteriológico.....

64

Quadro 6

Prognóstico da placa: Distribuição da frequência dos Grupos de estreptococos de CARLSSON em 27 placas dentais de 12 pacientes, e sua correlação, a longo prazo (6 meses) com relação à cárie (4 cáries) e à - descoloração do esmalte (4 descolorações).

67

Quadro 7

Prognóstico do paciente: Alterações patológicas (4 cáries e 4 descolorações do esmalte) em 8 placas dentais de 12 pacientes - nos quais se tinha verificado 6 meses antes a presença, ou a ausência dos Grupos - de estreptococos de CARLSSON.....

72

Quadro 8

Exame clínico em 27 placas dentais de 12 pacientes, 6 meses após a verificação de - presença, ou de ausência nelas de estreptococos dos Grupos de CARLSSON.....

74

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A importância do problema da cárie dental. Revisão da literatura sobre bacteriologia da cárie dental, com especial referência aos estreptococos. Proposições da pesquisa.

1.1 - A importância do problema da cárie dental

A flora microbiana oral, dada sua complexidade e frequentes variações, tem estimulado os investigadores na execução de trabalhos relacionando-a a alterações patológicas sediadas na boca.

Dentre os problemas orais, a cárie dental ocupa lugar de destaque por sua alta prevalência: 99% ou mais da população civilizada é acometida por tal processo, sendo, pois, um problema da Saúde Pública (CHAVES, 1960; VIEGAS, 1961). Obviamente traz transtornos ao indivíduo acometido, tais como:

- a. Alterações mastigatórias;
- b. Alterações estéticas;
- c. Dificuldades fonéticas;
- d. Ser causa indireta de periápícopatias, periodontopatias e maloclusões;

- e. Alterações generalizadas, condicionadas pelas alterações anteriores, bem como pela dor e pelo foco de infecção que com freqüência se instala;
- f. Problemas financeiros.

Sua etiologia, contudo, ainda é incerta, embora já - possamos contar com numerosos trabalhos dirigidos para sua elucidação.

1.2 - Revisão da literatura sôbre bacteriologia da cárie dental, com especial referência aos estreptococos

Tomando como ponto de partida a lesão cariada, e a saliva intimamente ligada a ela, a bacteriologia da cárie tem sido estudada nos seguintes aspectos:

- a. Exploração da flora oral presente na saliva;
- b. Identificação das bactérias que habitam a placa dental;
- c. Estudos complementares desses germes "in vivo" e "in vitro".

Os trabalhos que visam estabelecer diferenças nas floras orais de pessoas com alta e com baixa incidência de cárie, baseiam-se principalmente na quantificação de determinados germes; qualitativamente, diz-se, as floras são similares.

Lactobacilos, estreptococos, actinomicetos, leveduras, ou associações desses germes, têm sido incriminados nos processos cariosos, não somente pelo fato de se contarem em maior número em bôcas portadoras de dentes cariados, como por serem também relativamente acidogênicos e acidúricos. Estes estudos encontram, pois, apoio nas investigações pioneiras de W. MILLER - que, em 1890, estabeleceu os fundamentos para o atual conceito da etiologia complexa da cárie, postulando a teoria químico-parasitária que responsabiliza os ácidos produzidos pela microflora oral a partir de alimentos carboidratados.

Um revisão bibliográfica nos torna credenciados a afirmar que, entre os agentes etiológicos bacterianos, os lactobacilos foram considerados por diversos investigadores como os mais significativos. Os estreptococos, no último decênio, têm merecido a atenção de pesquisadores que, em explorações da microflora oral, os têm isolado em número superior aos das demais bactérias, revelando-se o seu poder cariogênico em inoculações experimentais em animais sem flora ("germ free") e em gnotobíotos. (*)

Fato de grande importância foi apresentado em 1897 por L. WILLIAMS, que evidenciou, através de uma série de fotomicrografias de secções de dentes, "massas de microorganismos" aderidos às superfícies dentais. Salientou que a massa de microorganismos era encontrada recobrando a superfície do dente onde se instalaria o processo de cárie. Considerava esta massa tão aderente e densa que tornava improvável que o esmalte fôsse afetado por outros ácidos que não os formados abaixo dela.

BLACK (1898) referiu-se a elas como "placas microbianas gelatinosas do Dr. WILLIAMS", introduzindo, pois, o termo "placa" na literatura odontológica.

Atualmente, o que poderia ser dito sobre placa dental, é que se trata de uma estrutura aderente que se forma sobre o dente, composta principalmente de bactérias produtoras de dextrana (polissacarídeo extra-celular); e que a freqüente ingestão de sacarose (o açúcar comum) na alimentação, determina comprovado e pronunciado aumento de volume e de número das mesmas. Obviamente, são distintas dos depósitos de matéria alba, que é de coloração esbranquiçada, de pouca consistência, usualmente associada à higiene oral deficiente.

(*) Como se sabe (FITZGERALD, 1963), animal destituído de micróbios ("germ free") corresponderia a um animal totalmente isento de micróbios; o termo gnotobíoto, a um animal do qual se conhece bem a flora limitada; e, enfim, animal convencional, ao comum, com a flora que lhe é habitual.

Em relação ao prognóstico de uma placa dental vir, ou não, determinar cárie, tem que ser ressaltada a existência de fatores adicionais essenciais (V. adiante). O que poderia ser afirmado é que a tendência maior de uma placa dental em relação à cárie, é determinar a sua formação.

A importância principal deste tipo de trabalho é reconhecer a causalidade de espécies bacterianas no processo de lesões cariosas para que métodos de controle específico possam ser empregados.

GOADBY (1910), que acreditava ser o Bacillus necrodentalis (Lactobacillus acidophilus) o responsável pela descalcificação do esmalte e da dentina, mudou de opinião, passando a suspeitar firmemente que certos estreptococos fôsem os causadores de cáries.

HARTZELL & HENRICI (1917) observaram que os estreptococos viridans eram encontrados constantemente nos bordos de cáries avançadas, e também nas camadas profundas, sendo mesmo encontrados em culturas puras e que, devido a seu aparente poder-invasor e ação necrotizante, deviam ser os responsáveis pelo processo carioso.

CLARKE (1924) isolou de cáries incipientes um estreptococo a que denominou Str. mutans, descrevendo, dentre suas principais características, a rápida produção de ácido, mudando o pH do meio de 7,0 para 4,2 em 24 horas. Acreditava que os bacilos acidófilos apareciam como invasores secundários, favorecidos pela reação ácida da lesão. A morfologia das diminutas cadeias de cocos que aparecia, quando a reação do meio era neutra, apresentava variação, tomando a forma de um bastonete, quando a reação era ácida. Convém, entretanto, lembrar que o pleomorfismo é uma regra geral entre os estreptococos.

MACLEANS (1927) confirmou os trabalhos de CLARKE (1924) incluindo uma descrição diferencial entre o Str. mutans e o Bacillus acidophilus. O Str. mutans fermentava com regularidade a

glicose, lactose, rafinose, manita, inulina e salicina, produzindo ácido, sem gás. O Bacillus acidophilus não apresentava constância nas fermentações dos carboidratos, porém, a glicose, lactose e sacarose eram fermentadas usualmente.

ANDERSON & RETTGER (1937), fazendo estudos em 65 indivíduos portadores de vários graus de cárie, deram maior importância aos estreptococos que aos lactobacilos, não somente pela sua natureza acidogênica como também por serem isolados, com maior frequência, à medida que o índice de cárie aumentava.

BIBBY & VAN KESTEREM (1939), fazendo culturas quantitativas de bactérias da saliva, obtiveram maiores contagens para os estreptococos do que para os demais germes; concluíram que os estreptococos fermentavam os carboidratos, mais rapidamente, que os lactobacilos, indicando, pois, que aqueles deviam ser mais importantes nos processos cariosos.

HAMMOND (1939) isolou de dentes cariados, o Str. viridans em colônias lisas e rugosas. Quando, das colônias rugosas se obtinham colônias lisas, a micromorfologia, que era bacilar, filamentosa reta, ondulada ou enrolada nas primeiras, passava a cocóide aos pares, ou em pequenas cadeias, nas segundas. Os microrganismos integrantes dessas colônias lisas eram hábeis formadores de ácido (pH 4,4-4,8) em caldo dextrosado de pH 7,0. Provando sua participação nos processos cariosos, reproduziu cárie "in vitro" colocando incisivos, caninos ou pré-molares (recentemente extraídos, previamente esterilizados e recobertos por cera nas suas porções radiculares), em tubos contendo caldo dextrosado a 1,0% de pH 7,0. O meio era inoculado com Str. viridans vindos de colônias lisas possuidoras somente de formas cocóides. O caldo era renovado semanalmente. Os dentes foram examinados após 14, 23 e 31 dias, 3, 4 e 6 meses. As primeiras erosões do esmalte foram notadas aos 14 dias. Preparações histológicas revelaram a presença de microrganismos no interior dos canalículos após 3 ou mais meses, sendo observados bastonetes, cocos e filamentos re-

tos ou enrolados. Comentou propondo similaridade desses microrganismos àqueles vistos por MILLER (1883) quando fez lâminas a partir de dentes com cáries naturais.

HAMMOND & TUNNICLIFF (1940) ampliaram os trabalhos de HAMMOND (1939), utilizando 20 dentes. Quatro deles foram tomados como controle: dois colocados em caldo dextrosado a 1,0%, - sendo o pH baixado artificialmente com ácido láctico para 4,0; - os outros dois foram igualmente colocados em tubo contendo caldo dextrosado e inoculado com B. coli. Após três meses, os dois primeiros apresentaram destruição do esmalte sem invasão dos túbulos por bactérias. No segundo controle, o pH girou em torno de 4,8, descalcificando o esmalte e revelando apenas bastonetes no interior dos canalículos. Nos dezesseis dentes básicos da experiência foram observados: destruição do esmalte já aos 14 dias e, após três meses, penetração de germes só em forma de cocos pelos canalículos, com aspecto semelhante ao de cáries incipientes naturais. Aos 4 meses, encontravam-se nos canalículos, além de cocos, também bastonetes e filamentos como nas cáries naturais avançadas, demonstrando que o Str. viridans, nas cáries avançadas, pode assumir a micromorfologia das culturas rugosas, que estariam a sugerir a presença de outras espécies bacterianas quando, na realidade, só temos uma presente.

BIBBY e colab. (1942) confirmaram os resultados anteriores acima referidos (BIBBY & VAN KESTEREN, 1939) bem como, - constataram diferenças na rapidez da produção de ácido entre algumas amostras de estreptococos. Salientaram que determinados estreptococos parecem especialmente adaptados a produzir ácidos em presença de esmalte e dentina; observaram também, que o pH nunca caía abaixo de 5,0, o que indicava ser este o ponto crítico para a desmineralização do dente; constataram a existência de uma relação direta entre a quantidade de dente desmineralizado e a acidez titulada.

TEFFT (1942), baseando-se em estudos anteriores sobre

a ocorrência dos estreptococos na cavidade oral, propôs a significância destes estreptococos na produção da cárie dental. Ampliou seus estudos (TEFFT & BIBBY, 1940), isolando e classificando 438 amostras de estreptococos orais, não hemolíticos, pelo método de identificação preconizado por SHERMAN (1937), encontrando:

220 amostras de Str. salivarius

110 " Str. faecalis

108 " Str. lactis

Indicou a possível significância desses estreptococos na cárie dental pela habilidade acidogênica do Str. faecalis e pelas largas contagens obtidas com os Str. faecalis e Str. lactis de material vindo de dentes cariados.

HARRISON (1948), em trabalhos em que verifica a presença de estreptococos e lactobacilos na cárie dental, concluiu que esses dois germes estão intimamente ligados ao problema. Associou os estreptococos à cárie avançada da dentina, responsabilizando os lactobacilos por lesões iniciais no esmalte. Não mencionou, contudo, a possibilidade de outras bactérias estarem implicadas no processo.

BELDING (1948) e BELDING & BELDING (1948a, 1948b) publicaram uma série de estudos em que correlacionam a dieta (*) rica em carboidratos à cárie dental. Citam o exemplo dos nativos havaianos e os colonos de Tristão da Cunha, cujas dietas eram ricas em determinados carboidratos que não a sacarose, e cujos índices de cárie eram diminutos. Quando incluíam, porém, sacarose a essas dietas, verificavam sensíveis aumentos nesses índices. Interpretando a ocorrência, indicaram que a inclusão da sacarose determinava um aumento do número dos estreptococos, fato que denominaram "estreptococose alimentar". Esta alteração da flora desenvolvia a capacidade de produzir ácido a partir da maioria dos

(*) Empregamos o termo dieta no mesmo sentido que comumente empregam os anglo-saxões, isto é, como diz PINTO (1962), "Regime alimentar".

alimentos adocicados, criando um ambiente favorável ao aparecimento dos germes acidófilos, entre os quais, os lactobacilos, - que por sua simultaneidade habitual, foram relacionados à cárie de modo similar ao que relaciona certos índices colimétricos à ocorrência de febre tifóide. O Str. odontolyticus (Str. salivarius) foi o responsabilizado...

WILLIAMS e colab. (1950) verificaram enterococos, lactobacilos e leveduras na saliva humana, encontrando, entre os primeiros, a seguinte ordem de ocorrência: Str. faecalis (82,2%), Str. liquefaciens (11,1%) e Str. zymogenes (6,6%). As análises revelaram que altas contagens de lactobacilos e baixas contagens de leveduras foram obtidas quando os enterococos estavam presentes. Os dados, entretanto, não revelaram que os enterococos pudessem servir como índice de presença ou ausência de cárie dental, entre os pacientes de quem a saliva foi obtida.

STRALFORS (1950), investigando a bioquímica da placa dental, estabeleceu que os açúcares difundidos nas placas dentais eram transformados pelas bactérias em ácido láctico. Sendo a ingestão de açúcares freqüente, a concentração de ácido láctico na placa é alta; o ácido, não podendo difundir-se na saliva, promove a descalcificação do esmalte. A taxa de produção de ácido pelos componentes da flora foi estudada, sendo os estreptococos descritos como os mais acidogênicos.

SHIERE (1951) apresentou um completo estudo sobre o Str. salivarius, do qual resultaram as seguintes conclusões: (a) O Str. salivarius é habitante normal da saliva. (b) Estatísticas evidenciam que sua freqüência é diretamente proporcional ao número de superfícies cariadas. (c) Metaboliza carboidratos mudando o pH para 4,0 à 5,0, suficiente para descalcificar o esmalte. (d) "In vitro" tem produzido erosões do esmalte. (e) Converte, com regularidade, alguns carboidratos a ácido láctico. - (f) Pode ser considerados como agentes potenciais da cárie...

MORRIS (1954), continuando uma série de estudos porme

norizados sobre a flora da cavidade oral, verificou que, na saliva, os estreptococos:

a) Constituem o grupo mais numeroso da cavidade oral, qualquer que seja a situação quanto à prevalência de cárie;

b) As espécies Str. salivarius, Str. mitis, Str. equinus, Str. brevis, Str. pyogenes, Str. faecalis e outros enterococos, bem como o Str. pneumoniae, foram isolados tanto de bocas com dentes cariados como não-cariados. Descreveu, também, grande número de estreptococos heterogênicos, que não puderam ser enquadrados em nenhuma das espécies existentes;

c) Os estreptococos encontrados mais frequentemente foram: Str. salivarius e os estreptococos do grupo heterogênico.

Quanto à relação desses estreptococos com a cárie dentária, encontrou:

a) Algumas amostras de Str. salivarius, vindas de bocas cariadas, atacavam maior número de carboidratos, porém não foram constatadas diferenças nas propriedades acidúricas e acidogênicas, segundo sua proveniência;

b) Os Str. equinus e Str. mitis foram observados em bocas geralmente com baixo índice de cárie;

c) O Str. faecalis foi encontrado com grande frequência em bocas de cárie ativa.

KRASSE (1954c) condensando os achados de uma série de trabalhos (KRASSE 1953, 1954a e 1954b), refere que:

a) A flora oral varia de uma parte para outra na boca e a proporção de organismos na saliva difere largamente. Consequentemente, a flora da saliva estimulada nem sempre é representativa da flora da placa. Assim no uso de material de prova:

1. A saliva estimulada pela parafina pode ser usada na correlação de lactobacilos e Candida e a cárie dental;

2. A flora da placa dental permite correlacionar, estreptococos e outros germes acidogênicos à cárie dental;

3. O material de placa dental e não da saliva pode ser

usado quando a inter-afinidade de vários organismos e a cárie es tão sendo investigados mutuamente.

PIGMAN e colab. (1954), com experiências firmadas em trabalhos anteriores, empregando um aparelho que denominaram de "Boca artificial", observaram que o ataque ao esmalte dental somente ocorria quando a glicose estava presente no meio, e quando participavam os estreptococos, lactobacilos, ou ambos. Observou também, nas mesmas condições, destruição da dentina.

ORLAND e colab. (1955), demonstraram que ratos sem flora ("germ-free") não desenvolviam cáries, quando mantidos em dietas cariogênicas, para animais convencionais. ORLAND e colab. (1954) observaram que cáries podiam ser induzidas nestes animais sem flora, com uma amostra específica de enterococos, obtida de lesões cariosas de ratos convencionais. Para provar isto, utilizaram dois grupos de animais: um, sem flora, e outro, convencional, aos quais administraram dieta cariogênica. Verificaram que:

1. Animais sem flora, ou apenas com bactérias pleomórficas, não desenvolveram cáries;

2. Animais convencionais, apresentaram cáries;

3. Animais sem flora, inoculados (via oral) com enterococos e bacilo Gram-negativo altamente proteolítico, ou inoculados com enterococos e mais uma bactéria pleomórfica, desenvolveram cáries. As bactérias proteolíticas não aumentaram a severidade das lesões descritas. Para todos os grupos experimentais, o tempo mínimo de observação, foi de cinco meses.

BIBBY (1956) destacou que, na realidade, não existem provas de que um só organismo seja responsável no processo de cárie; qualquer germe produtor de ácido pode contribuir para a des calcificação. Os estreptococos, dada sua atividade acidogênica e seu elevado número na flora oral, são de importância evidente. - Teceu comentário em torno da matriz orgânica em que fenômenos fi sicos podem participar.

MAHLER & MANLY (1956), trabalhando com placas dentais

naturais e experimentais (estas preparadas com amostras puras de microrganismos orais), procuraram determinar a variação do pH em certas condições. Através dos resultados, puderam verificar que os estreptococos têm papel significativo na formação de ácido; quanto aos lactobacilos, os consideraram de significação inferior devido à sua baixa freqüência de ocorrência.

PIGMAN (1957) testou a ação cariogênica de determinados germes na "Boca artificial", entre outros, os Str. salivarius e Str. faecalis foram testados. Surgiram descalcificações que não os eximiram da responsabilidade de agentes participantes no processo carioso.

WINKLER & BACKER-DIRKS (1958) fizeram detalhado estudo em torno da placa dental; analisaram seu mecanismo de formação, sua composição, as variações quanto à espessura, - composição química e flora bacteriana, segundo sua localização na cavidade oral, e no dente. Estabeleceram que, pelo menos 70% do volume total da placa é constituído por bactérias. Os estreptococos são mais numerosos, ocorrendo na proporção de 70% da flora; Neisseria e Veillonella, juntamente com as formas filamentosas, quase interam os 100%. Lactobacilos, difteróides, leveduras e actinomicetos estão presentes em quantidades diminutas. Esses, mesmos autores evidenciaram que a queda do pH depende da concentração de açúcares, do número de - bactérias acidogênicas e da espécie bacteriana.

YARDENI e colab. (1959) fizeram raspagens em dentes hígidos e em torno de cavidades cariosas de pequena extensão; inocularam o material assim obtido em infuso-cérebro-coração. Dentre os microrganismos, os mais freqüentemente obtidos foram os estreptococos micro-aerófilos, tendo sido isolados em culturas puras a partir de áreas com tendência de tornarem-se cariadas. Em lesões cariosas de alguma severidade isolaram número proporcionalmente grande de estreptococos, que evidencia

va seu poder invasor. Os estreptococos observados pertenciam ao grupo viridans.

FITZGERALD e colab. (1960) procuraram reproduzir os achados de ORLAND (1955), através de estudos mais acurados. Empregaram amostras de estreptococos isolados do trato oral de ratos portadores de atividade cariogênica elevada; essas amostras, entretanto, não se identificaram a nenhum dos principais grupos conhecidos. Todos os animais foram alimentados com a mesma dieta cariogênica. Cáries não foram observadas em nenhum dos animais contrôle; os monoinfectados desenvolveram, em seus molares, extensas cáries, que evidenciavam o poder cariogênico dos estreptococos empregados.

FITZGERALD & KEYES (1960), com o objetivo de demonstrar o papel etiológico dos estreptococos em cáries experimentais de "hamsters", isolaram e testaram 5 amostras de estreptococos, 6 de difteróides e 6 de lactobacilos obtidos de "hamsters" cárie-ativos; foram também testadas, outras 6 amostras de estreptococos obtidas de animais da mesma espécie, sem atividade cariosa. Nenhuma destas amostras mostrou-se proteolítica. Os animais usados na experiência eram de linhagem resistente à cárie (KEYES, 1960), sendo infectados com todos os germes isolados, e alimentados com dieta cariogênica; as observações se prolongaram por período de 35 a 70 dias. Cáries foram observadas somente nos animais inoculados, com qualquer uma das 5 amostras de estreptococos isoladas dos animais com atividade cariosa. As outras bactérias foram incapazes de produzir cárie. Neste mesmo trabalho provaram a transmissibilidade da cárie em roedores. Obtiveram estreptococos resistentes à estreptomina que, contudo, não perderam suas propriedades cariogênicas. Colocaram numa mesma gaiola "hamsters" com cáries desenvolvidas por êsses estreptococos e "hamsters" da mesma linhagem cárie-inativos. Ao fim - de algum tempo puderam recolher das fezes e das lesões cariosas desenvolvidas nestes últimos, estreptococos estreptomina^rresistentes.

Tal não ocorria, porém, se os animais fôsse mantidos em gaiolas separadas na mesma sala. Neste trabalho evidenciaram também a relativa especificidade, entre os próprios estreptococos, em determinarem cárie, visto que estreptococos cariogênicos para o rato (FITZGERALD e colab., 1960), apesar de serem recolhidos das cavidades orais dos "hamsters", não determinaram cárie ao fim da experiência.

KEYES (1962) apresentou uma revisão dos então recentes progressos microbiológicos ligados à cárie dental. Destacou que a atividade de cárie dental é determinada pela interferência de três fatores essenciais: hospedeiro, flora microbiana e regime alimentar;

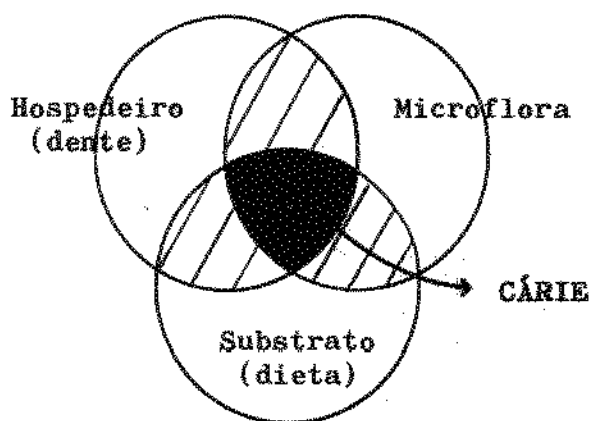


Fig. 1 - A complexa etiologia da cárie dental; fatores essenciais determinantes.

Normalmente a fêmea convencional de "hamster" transmite sua flora microbiana aos seus descendentes; contudo, se alimentarmos à mãe com uma dieta padronizada e que contenha penicilina, os filhos nascem livres de alguns germes e permanecem livres de cáries, embora alimentados com dieta rica em car

boidratos e pobre em gorduras. Nestes animais, cáries podem ser induzidas desde que se utilize dieta cariogênica, mediante:

- a) Contato com animais convencionais;
- b) Inoculação de estreptococos indígenas dos convencionais;
- c) Inoculação de amostras de estreptococos cariogênicos estreptomycinarresistentes;
- d) A transferência de placas dentais de hospedeiros infectados.

GIBBONS & SOCRANSKY (1962) aventaram a possibilidade da síntese de polissacarídeo bacteriano intracelular, tipo glicogênio-amilopectina, desempenhar papel importante na etiologia da cárie. Numerosos microrganismos da placa dental produzem este tipo de polissacarídeo: os estreptococos, difteróides e fusobactérias são os principais responsáveis. Culturas puras de estreptococos têm-se apresentado como metabolizadores do polissacarídeo armazenado, determinando a produção de ácido láctico. Comparações entre placas dentais de pacientes cárie-ativos e inativos revelaram que os primeiros contêm proporções mais altas de microrganismos produtores destes polissacarídeos, que os segundos.

FITZGERALD (1963) fez considerações evidenciando os estudos realizados em animais sem micróbios ("germ free") e em gnotobiotos:

- a) Está estabelecido que cáries não podem ocorrer nesses animais na ausência completa de germes, mesmo que mantidos em dietas cariogênicas;
- b) Monoinfecções com certos estreptococos podem determinar cárie em ratos, desde que sejam alimentados com dieta cariogênica;
- c) Os microrganismos até então conhecidos como produtores de cáries não são proteolíticos.

Conclue seu relato afirmando que estudos bioquímicos dos estreptococos cariogênicos revelaram sua grande capacidade a

cidogênica, ressaltando contudo, que a produção de ácido "per se" não é um fator determinante, visto que lactobacilos e outros estreptococos, igualmente acidogênicos, testados, não foram indutores de cáries. Destaca o autor ser prematura qualquer transposição de situação para o ser humano; contudo, estas investigações não podem ser ignoradas, pois poderão servir de apoio a futuros estudos no homem.

ZINNER e colab. (1964), com o objetivo de produzirem cáries "in vitro" em dentes humanos, e "in vivo" usando animal de laboratório, isolaram de cáries iniciais humanas de 6 indivíduos, 6 amostras de estreptococos. Isolaram também, de cáries de "hamster" e de ratos, estreptococos que foram utilizados para produzir anticorpos específicos, e que foram conjugados ao isotiocianato de fluoresceína. Das 6 amostras, 4 reacionaram positivamente com o conjugado anticorpos-fluoresceína de "hamster", e uma, com o conjugado anticorpos-fluoresceína de rato. Os seis isolados humanos apresentaram-se fluorescentes com ambos os anticorpos, porém, somente "hemisfêricamente" (sic). Uma das amostras, reacionante com os anticorpos marcados de "hamster", foi colocada em um tubo de cultura com dente humano (esterilizado e aparentemente íntegro). Após 8 semanas foi constatada a cárie. Por outro lado, tubos de controle com dentes não inoculados, ou inoculados com germes de reações aberrantes, ou ainda com amostra de reação positiva para anticorpos de ratos, não deram cárie. Numa terceira série de estudos, verificaram que cáries em dentes humanos podiam também ser produzidas com amostras oriundas de "hamster" ou de ratos. Em nenhuma fase da experiência o pH desceu abaixo de 6,0. Na segunda parte do trabalho, "hamsters" foram infectados através de zaragatoas gengivais ou por água infectada com cada uma das 6 amostras, e com amostras do próprio "hamster". Foram observadas cáries quando o estreptococo de origem humana era de reação positiva aos anticorpos de "hamsters" ou oriundo deles próprios. As amostras

cujas reações foram aberrantes e a amostra positiva para anticorpos de rato, falharam em determinar cárie. Estas observações sugerem que certos estreptococos podem ter um papel etiológico em cáries humanas e podem exibir reatividade cruzada - nos hospedeiros.

KRASSE (1965b), estudando as variações da dieta e a - implantação de estreptococos cariogênicos estreptomycináresistentes em dois grupos de "hamsters", observou que, quando se dava uma dieta contendo 56% de sacarose, os estreptococos eram recuperados em largo número, sendo que os animais apresentavam grande número de cáries; substituindo-se a sacarose por quantidade equivalente de glicose, poucos microrganismos puderam ser recuperados, sendo o número de cáries reduzido, ou nulo.

SIMS (1965) propôs-se a estudar as médias da produção de ácido de agregados superficiais de lactobacilos, estreptococos e outras bactérias orais. Observou que variavam grandemente, dependendo da inerente capacidade de produção de ácido do germe, bem como de sua concentração numa superfície. Pelos dados obtidos somente os estreptococos alcançaram concentrações elevadas, o que fez acreditar serem eles os responsáveis pelos primeiros ataques ao esmalte.

CARLSSON & EGELBERG (1965), apresentando um estudo que relacionava o efeito da dieta na formação de placas dentais em seres humanos, observaram que elas se avolumavam quando a sacarose era consumida em grande escala. Se o consumo fôsse de glicose, não se observava êste fato. Sugeriram que bactérias formadoras de polissacarídeos extra-celulares, quando em presença de sacarose, como acontece com o Str. salivarius, poderiam estar implicadas no processo.

CARLSSON (1965a) encontrou um número alto de Str. salivarius tanto em placas dentais como em saliva, quando era da do ao paciente uma dieta com alto teor de sacarose; tal não acontecia se a sacarose fôsse retirada da dieta, ou substituída pela glicose. Observou, entretanto, que as quantidades dessas

estreptococos eram semelhantes, quer na saliva, quer nas placas, durante o período de experiência com os açúcares. Isto sugere que o Str. salivarius nas placas dentais, deveria ser contaminante a partir da língua, seu "habitat" habitual, e que não cresciam em graus apreciáveis nas superfícies dentais, não parecendo que o Str. salivarius tivesse papel preponderante na formação de placas nos pacientes estudados.

CARLSSON (1965b), com bases em observações anteriores, cultivou placas dentais de três e sete dias em ágar "Mitis-salivarius". Observou que, pelo menos 50% das bactérias cultivadas formavam "zooglêias" de firme consistência. Através de estudos bioquímicos e comparações com culturas-padrão, concluiu que grande número de estreptococos das placas eram semelhantes ao Str. sanguis.

ZINNER e col. (1965a) confirmaram os trabalhos de FITZGERALD & KEYES (1960), produzindo cárie em "hamster" com amostra HS-1 de estreptococos; evidenciaram também que estreptococos similares (amostra AHT) estão presentes em cáries dentárias humanas, e que eles podem reproduzir estas doenças no "hamster". Salientaram que a técnica de usar anticorpos específicos marcados com fluoresceína, facilita o reconhecimento destes microrganismos. A amostra BHT, algumas amostras de lactobacilos e o terceiro e último grupo de reação positiva aos anticorpos marcados (amostra CHT), não foram capazes de produzir cárie nos "hamsters". Os achados permitem que se levante a hipótese de que as amostras designadas AHT possam estar relacionadas etiológicamente à cárie no homem. Culturas obtidas de 11 bocas, sem cárie, foram negativas quanto à presença de estreptococos similares aos três grupos anteriormente descritos. É interessante salientar que amostra BHT é morfológica e antigênicamente semelhante à amostra de estreptococos cariogênicos para o rato (FA-1) (FITZGERALD e colab., 1960) e que ZINNER e colab. (1965b) induziram cáries em ratos com essa amostra.

KRASSE (1966), no estudo de 2 (dois) pacientes altamente cárie-ativos observou que, quando placas dentais desses pacientes eram cultivadas em ágar "Mitis-salivarius", as colônias de estreptococos observadas eram morfológica e bioquimicamente semelhantes àsquelas das amostras indutoras de cáries em "hamsters". A introdução destas amostras em cavidade oral de "hamsters", desde que alimentados com dieta cariogênica, determinavam cárie.

GIBBONS e colab. (1966) isolaram de lesões cariosas humanas, estreptococos que provaram ser cariogênicos quando testados, em culturas puras, em ratos gnotobiotos. Observaram também, que nem todos os estreptococos presentes em número elevado nas lesões cariosas humanas, são cariogênicos em culturas puras; as características bioquímicas e sorológicas dos estreptococos cariogênicos humanos, indicam que são similares aos estreptococos dos roedores; formam grandes quantidades de polissacarídeos intracelulares que são catabolizados quando o conteúdo do meio em carboidratos é escasso; sintetizam ainda polissacarídeos extra-celulares (cápsulas), de material semelhante a carboidratos, a partir da sacarose, ao passo que as amostras não-cariogênicas formam quantidades menores, sugerindo pois, que, a formação de cápsula seria de grande importância no processo cariogênico. Constataram ainda que os microrganismos cariogênicos, quando cultivados em caldo hipersacarado, são observados aderentes às paredes do tubo, formando massa gelatinosa; bem como que, as cáries produzidas pelas diferentes amostras, determinam lesões cariosas em locais diferentes do dente.

JORDAN & KEYES (1966) investigaram um método para estudar "in vitro" a formação de placas e de lesões cariosas. Estreptococos reconhecidos como cariogênicos formaram placas volumosas em: dentes hígidos, dentes de porcelana ou acrílico, - rolha de vidro e fio de aço inoxidável esterilizados (120°C-20 min.), sendo expostos para o crescimento de microrganismos, as

diferentes superfícies foram mergulhadas sucessivamente: a) durante 3 horas em caldo contendo 0,1% de sacarose e previamente inoculado com uma cultura recente de estreptococos; b) durante 1 hora em solução de sacarose 5% e H_2HPO_4 (0,1%) de pH final 7,0; c) durante 3 horas em solução de saliva sintética (meio líquido contendo mucina). Após 3 dias verificaram-se formação de pequenos nódulos de aumento progressivo, ao fim de 2 semanas observaram-se grandes deposições. Estreptococos não cariogênicos não formaram placas. A sacarose foi requerida para a produção de placas não podendo ser substituída. A mucina sintética foi considerada essencial para a produção de placas neste sistema. Organismos filamentosos formaram placas moderadas. Dentes humanos hígidos após 3 semanas exibiram grandes acúmulos de placa e lesões cariosas incipientes.

GIBBONS & BAGHART (1967) propuzeram-se a fazer um minucioso estudo sobre as propriedades químicas e sorológicas do polissacarídeo extra-celular, sintetizado pelas bactérias cariogênicas, bem como procuraram demonstrar sua presença na matriz da placa dental humana. Observaram inicialmente que estes polissacarídeos eram sintetizados por estreptococos cariogênicos de roedores e do homem, e podiam ser descritos como semelhantes a dextranas. As melhores condições para se conseguir a síntese dos polissacarídeos foram as do caldo sacarosado a 10%. Observaram ainda existir similaridade entre as dextranas sintetizadas por amostras cariogênicas de estreptococos humanos e de roedores, bem como de uma amostra cariogênica de Lactobacillus acidophilus. A dextrana observada é relativamente resistente ao ataque da flora microbiana oral e forma precipitados insolúveis quando, em contato com sêro, com saliva passada por filtro clarificante, e com várias soluções protéicas, tendo ainda o poder de aderir-se à hidroxiapatita pulverizada; isto sugere que ela possa também aderir-se às superfícies dentais na boca. Concluíram que a produção de dextranas torna hábeis os microrganismos

mos formadores a constituir a placa dental que é pré-requisito para a produção de cárie dental.

JURGENSEN & ARAUJO (1967) reproduziram os trabalhos de JORDAN & KEYES (1966), sendo empregado um esquema de trabalho mais simplificado; a formação de placas se deu "in vitro" na superfície de um bastão e laminula de vidro. A amostra utilizada, SL 1 cariogênica para "hamsters", foi incubada em caldo com 5% de sacarose (ágar Mitis-salivarius modificado, BBL). A incubação foi em microaerofilia e a transferência da laminula e bastão se deu com intervalos de 48 horas por 15 dias. Após 3 dias pequenos nódulos foram observados; com 15 dias verificaram-se grandes acúmulos. Não ocorreu placa quando a glicose foi utilizada e a deposição ocorreu na ausência de mucina.

KRASSE e colab. (1967) estudaram a possibilidade de se implantar estreptococos cariogênicos na cavidade oral humana. Observaram que tanto os estreptococos cariogênicos do homem podiam ser implantados, como também, com maiores dificuldades, os de "hamsters". Observaram ainda que, a ingestão frequente de açúcar comum favorece a implantação e que, a restrição deste hidrato de carbono não elimina os estreptococos - marcados, porém, reduz bastante o número de colônias recuperadas quando se faz contagem de unidades viáveis. Estabeleceram fundamentos para a hipótese de que cárie dental em seres humanos, pode ser doença transmissível.

CARLSSON (1967a) se propôs a estudar a distribuição de vários tipos de estreptococos não hemolíticos em placa dental e em outros locais da cavidade oral do homem. As experiências foram realizadas com 4 (quatro) pacientes durante dois períodos de três dias; num dos períodos a dieta básica era suplementada com frequentes ingestões de sacarose e, no outro, similarmente, com a glicose. A quantidade, em volume, de placa dental obtida quando a dieta básica era suplementada com sacarose, foi significativamente superior a de quando a glicose foi consu

mida. Observou que, das placas dentais, estreptococos produtores de dextranas, como acontece com o Str. sanguis, foram as bactérias dominantes, sendo sua prevalência baixa nas demais partes da cavidade oral. A placa dental se mostrou também o mais favorável "habitat" para o Str. mutans, "indutores de cárie" segundo KRASSE (1966). Do dorso da língua isolou com frequência o Str. salivarius, mas este estreptococo é o constituinte menos frequente da flora da placa. Não registrou a ocorrência de enterococos.

DE STOPPELAAR e colab. (1967) procuraram detectar a presença, em 24 (vinte e quatro) placas dentais humanas, de bactérias formadoras de dextrana num meio hipersacarosado (especialmente confeccionado à base de Trypticase, extracto de levedo e cistina); isolaram germes que descreveram como semelhantes aos Str. bovis e Str. sanguis. Para esses autores, as amostras de estreptococos HS-1 (cariogênicas para o "hamster", FITZGERALD & KEYES, 1960), e a amostra de estreptococo GS-5 (cariogênica para ratos gnotobiotos) são semelhantes ao Str. bovis. Os estreptococos "indutores de cárie" descritos por KRASSE (1966), bem como os estreptococos dos Grupos I (sub-Grupo II) e II de CARLSSON (1967a), este correspondente ao Str. mutans de CLARKE (1924), possuem características comuns com o Str. bovis.

CARLSSON (1967b), com o objetivo de tornar mais seguras e mais práticas as novas pesquisas em torno do Str. mutans, propôs um meio de cultura quase seletivo para esses estreptococos que permite reconhecimento de sua presença mesmo que ocorram em pequenos números (*).

MCCABE e colab. (1967) idealizaram uma simplificação de produção de placas microbianas "in vitro" (JORDAN & KEYES 1966). O potencial de formação de placas foi avaliado por com-

(*) Esse trabalho, de publicação muito recente (dezembro de 1967), só chegou ao nosso conhecimento quando já estavam prontas quase todas as nossas observações experimentais.

parações em sua habilidade de crescimento em fio de niocrômio suspensos em caldo sacarosado (5%), glicosado (5%) ou com amido (5%). A participação da mucina foi testada pela adição de 0,4% de mucina gástrica de cão a cada cultura fluida. As amostras indutoras de cárie em "hamsters" (E 49, origem de "hamsters"; SL 1, origem humana; BF 1, origem humana), formaram visíveis depósitos em sacarose; a quantidade obtida em BF 1 foram menores. As amostras humanas BF 1 e CHT foram as únicas que formaram algum depósito em glicose. Organismos filamentosos foram também testados, sendo encontrado que amido também favorece a produção de placas, como a glicose e a sacarose, ou mais. Mucina não foi requerida porém em algumas ocasiões, - melhorou a formação de placas.

FITZGERALD e colab. (1968) com dextranases obtidas do Penicillium funiculosum, estudaram um possível método de controle de cárie, pela degradação da dextrana formada. A susceptibilidade observada em placas artificiais de conhecidos estreptococos cariogênicos variaram em função da dextranase empregada (diferenças no peso molecular). Entretanto o fato que pelo menos algumas placas bem estabelecidas foram suscetíveis a desintegração, evidencia que este enzimo merece melhores estudos "in vivo".

TANZER e colab. (1968) na tentativa de determinarem, se a formação de placas dentais "in vivo" poderia ter-se originado de mutações e seleções naturais de tipos previamente não formadores de placas na cavidade oral, selecionaram "in vitro" estreptococos formadores de placas por uma série de - passagens de fios de niocrômio em caldo sacarosado. A técnica usada para a determinação de produção de placas foi de McCABE (1967); foram empregados 8 estreptococos não indutores de cárie em "hamsters" e 8 indutores. Verificaram que das 8 amostras não indutoras, 3 adquiriram a habilidade de produzir placas e 3 não. Dez amostras produziram placas amplamente. As ex

periências revelam que a formação de placas "in vitro" é propriedade hereditária, resultante de indução enzimática na presença da sacarose. Esta experiência sugere uma possível maneira pela qual amostras formadoras de placas desenvolvem-se a partir de outras não formadoras com a capacidade de sob a influência da sacarose tornarem-se mesmo mais adesivas à superfície do dente.

GIBBONS & BANGHART (1968) observaram formação de placas e potencial cariogênico de duas amostras adicionais de estreptococos, também produtores de polissacarídeo extra celular a partir da sacarose. Cáries dentais foram induzidas com a amostra SS2, produtora de levana, isolada da cavidade oral humana e com a amostra SBEL, produtora de dextrana isolada do sangue de um paciente com endocardite sub-aguda bacteriana. Observaram a necessidade da interação da dieta para a produção de lesões. A amostra SS2 formou menores quantidades de placas e lesões de fissuras, em ratos gnotobiotos, quando êstes foram alimentados com a dieta cariogênica 585. Com a dieta 2.000 induziram lesões cariosas próximo da raiz com perdas ósseas. A amostra SBEL, com a dieta 2.000, induziu cáries nas fissuras, faces lisas e alterações ósseas. Estas duas amostras não relembram nenhuma das espécies descritas no MANUAL DE BERGEY (1957), diferindo inclusive das outras amostras de estreptococos indutores de cárie descritos, pois nenhuma fermentou o manitol e o sorbitol, características previamente associadas ao potencial cariogênico (FITZGERALD & JORDAN, 1968). Por outro lado, houve falta de reatividade de algumas amostras indutoras de cárie, previamente descritas, com os anticorpos marcados com a fluoresceína AHT e BHT descritos por ZINNER & JABLON (1968). Existindo heterogenidade bioquímica dentro de um mesmo grupo sorológico, por ex. FA 1, E 49 e SS2 sorologicamente semelhante a BHT. Assim, os estreptococos com potencial cariogênico parecem ser um grupo um tanto heterogêneo de organismos. Contudo, os estreptococos cariogênicos formadores de placa possuem algumas características comuns. Sintetizam polissa

carídeos extra celulares a partir da sacarose (WOOD & CRITCHLEY, 1966; GUGGENHEIM e colab., 1966; GIBBONS & BANGHART, 1966; FITZGERALD & JORDAN, 1968). São altamente acidogênicos (ZINNER & JABLON, 1968; FITZGERALD & JORDAN, 1968) sintetizam também carboidratos de reserva (intra-celulares) que podem aumentar a duração da produção de ácido (BERMAN & GIBBONS, 1965; FITZGERALD & JORDAN, 1968).

CAMARGO e colab. (1968) baseados nos estudos de JORDAN & KEYES (1966) investigaram a ocorrência de microrganismos formadores de placa "in vitro" com material colhido diretamente de placas dentais, semeando-os em caldo tamponado com 5% de sacarose (Mitis-salivarius líquido), empregando tubo capilar como superfície de deposição do material mucilaginoso. A amostra SL 1 foi utilizada como controle. Placas dentais de 64 pacientes - foram examinadas e os tubos incubados a 37°C em microaerofilia; de cada 48 horas os capilares eram transferidos para novo caldo hipersacarosado não inoculado, passados antes, em salina estéril para remover o crescimento não aderente ao capilar. Dos casos examinados:

13 apresentaram-se negativos (-)

15 positivos sem crescimento saliente (+)

23 positivos e saliente (++)

13 e SL 1 positivo, saliente e abundante (+++)

Esfregaços revelaram estreptococos como predominantes. As colônias de estreptococos formadoras de placa "in vitro" - cresceram fortemente aderentes às paredes do tubo e do capilar, resistindo a agitação vigorosa em salina.

CARLSSON (1968), após estudos realizados em superfícies limpas de dentes em que analisou os estágios iniciais na formação da agregação microbiana da placa dental, pôde concluir:

a) Existe um padrão morfogenético na formação da placa dental. Uma película, inicialmente sem microrganismos, é formada. As agregações microbianas aparecem nos defeitos das superfícies dentais e colônias isoladas se distribuem pela superfi-

cie;

b) A ingestão de uma dieta com alimentos de consistência branda suplementada com sacarose, resulta em placas dentais abundantes;

c) Str. sanguis e Str. mutans estão entre os ecológicamente dominantes em placas primárias. Possuem estes germes a característica de formar polissacarídeos extra-celulares (dextranas) a partir da sacarose, o que é de importância fundamental na formação da placa;

d) Após a ingestão freqüente de sacarose, um apreciável volume de placa dental é ocupado pela matriz intermicrobiana, composta principalmente de carboidratos.

Conclui estabelecendo que, os dados obtidos em uma série de trabalhos permitem indicar que os estreptococos têm um importante papel no estabelecimento da flora microbiana do dente. Quando sacarose é incluída na dieta, uma alta proporção destes estreptococos produzem polissacarídeos extra-celulares que podem servir de matriz na placa, prendendo as bactérias, e ancorando-as ao dente, o que favorece a formação de placas dentais de grandes proporções.

1.3 - Proposições da pesquisa

Sendo alguns estreptococos isolados de lesões cariosas de dentes humanos, capazes de produzir cáries "in animal" (em dentes de "hamsters" e ratos; ZINNER e colab., 1964, 1965a e 1965b; KRASSE, 1966; GIBBONS e colab., 1966), ocorreu nos verificar, "in animal nobili", o possível significado etiológico a longo prazo de estreptococos daquelas espécies (*), em placas dentais humanas de dentes ainda sem cárie.

(*) A noção de espécie em bacteriologia corresponde apenas a um conceito, e não a uma realidade (LWOFF e colab. 1958). A rigor deveria chamar-se biótipo. É particularmente oportuno lembrar estas limitações quando se trata, como no caso, de um grupo bacteriano ainda insuficientemente estudado, aparentemente ligado ao fator microbiano da complexa etiologia da cárie dental. Conservamos, entretanto, a denominação de espécie por motivos de ordem prática, querendo referir-nos a certas culturas puras, com certas características.

Para tal nos propusemos:

- a) Isolar estreptococos de raspados dentais, localizados em terceiros molares íntegros, faces vestibular e distal;
- b) Determinar a quantificação (culturas quantitativas) ~~das~~ grupos de estreptococos em ágar "Mitis-salivarius";
- c) Verificar a classificação bacteriológica destes estreptococos através de métodos bioquímico-fisiológicos, tomando por base os trabalhos recentes a respeito;
- d) Relacionar a presença e a quantificação destes estreptococos, ou sua ausência, em pacientes com diferentes índices CPO-S;
- e) Relacionar a presença de estreptococos "indutores de cárie" (KRASSE 1966), e dos demais estreptococos, a exames clínicos executados 6 meses após a colheita do material (atividade cariogênica).

Capítulo 2

MATERIAL E MÉTODOS

Normas para a seleção - dos pacientes. Colheita e pesagem dos raspados dentais. - Meios de cultura. Contagem de colônias, isolamento e - conservação dos estreptococos. Normas para a identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON. Descrição das provas de identificação. Ensaio prévio dos meios de cultura e das provas de identificação.

2.1 - Normas para a seleção dos pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo são oriundos de nível sócio-econômico de médio a elevado, constituído, na sua maioria, de alunos que, em 1967, se encontravam nas 1ª e 2ª séries do curso de Odontologia desta Faculdade.

Como norma para a seleção dos mesmos usaram-se os seguintes critérios:

a) Que possuíssem pelo menos dois dos seus terceiros molares totalmente erupcionados e em estado de higiene.

b) Que apresentassem saúde oral satisfatória, principalmente dos tecidos de suporte dos dentes, como também das porções anatômicas próximas. (Ausência de gengivite, amidalite, --

etc...);

c) Que não tivessem tomado nenhum antibiótico nos dois últimos meses;

d) Que não tivessem o hábito de usar culutórios;

e) Que tivessem idade entre 18 e 22 anos.

Foram também selecionados três clientes de nossa clínica particular por preencherem os quesitos acima mencionados e por oferecerem índices baixos de incidência de cárie (CPO-S).

O número total de pacientes selecionados para o estudo foi de 15, com que iniciamos os nossos trabalhos. Entretanto, pudemos completar as observações de 12 deles, dos quais se estudaram 27 superfícies dentais, tendo-se isolado 81 amostras de estreptococos aí existentes. Estas amostras foram identificadas sendo submetidas, cada uma delas, a 17 provas de identificação, e como houve repetição de provas, o número total de provas feitas para a identificação final ascendeu a mais de 2000.

2.2 - Colheita e pesagem dos raspados dentais

Para a colheita do material dental, foi feito isolamento do dente, para o que se utilizaram róis de algodão esterilizados, que foram colocados junto ao mesmo, evitando-se contato direto com a saliva; porções remanescentes desta, foram removidas com o auxílio de mechas de algodão esterilizados, conseguindo-se o que se chama de isolamento relativo. (PARULA e colab., 1964).

Tomando-se todos os cuidados de assepsia, os raspados dentais foram obtidos dos terços médio e inferior da porção coronária das faces vestibulares e distais dos terceiros molares, por meio de curetas de McCall, números 13 e 14, evitando-se o sulco gengival; depositados em retângulos de papel alumínio "Rochado" de 2 x 3 cm, no interior de placas de Petri, ao lado de pequena porção de algodão que, sendo molhado com água no momento da colheita, evitava dessecação e conse-

quentes alterações do pêsó do material. Estas colheitas foram realizadas com os pacientes em jejum, ou após duas horas da última ingestão de alimentos (THE TENNESSEE DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH, 1961).

O conjunto raspado-dental-e-papel-de-alumínio, foi - pesado em balanças elétricas Mettler tipo H-15, de sensibilidade de 0,0001g. Com o auxílio de sonda exploradora número cinco e pinça hemostática, o raspado dental foi transferido para o tubo de homogeneização que continha pérolas de vidro de 1mm de diâmetro onde, posteriormente, era colocada a quantidade de diluente necessária (HOWELL e colab., 1962; LITTLETON e colab., 1967). O papel de alumínio era novamente pesado, e da diferença das pesagens, determinava-se o pêsó exato de placa dental.

Quando o material foi colhido em nossa clínica particular, não sendo possível pesá-lo imediatamente, usou-se, conforme indicação em RIGATTO & SOLÉ-VERNIN (1967), uma gôta de glicerina pura e esterilizada na superfície do papel de alumínio; a pesagem deste conjunto era realizada antes e depois da colheita da placa dental. Tal procedimento se revelou eficiente para evitar dessecações com alterações do pêsó, e um endurecimento do raspado que o tornaria dificilmente homogeneizável.

2.3 - Meios de cultura

As fórmulas são dadas em gramas por litro de meio de cultura.

a. Ágar "Mitis-salivarius" (CHAPMAN, 1946), adaptado.

Trypticase (BBL)	10,0
Polypeptone (BBL)	10,0
Glicose (Carlo Erba)	1,0
Sacarose (Comercial)	50,0
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,0
Azul de Tripan (Harleco)	0,075
Cristal Violeta (Merck)	0,0008
Ágar-ágar (Oxoid nº 3)	16,0

pH final 7,3

Esterilização: 121°C por 15 minutos.

Adicionar, quando o meio atingir a temperatura de 45 a 50°C, 1ml de uma solução aquosa de telurito de potássio a 1% esterilizada pelo vapor fluente por trinta minutos. Não reaquecer o meio após a adição de telurito. Posteriormente, a esterilização do telurito foi efetuada por filtração e os resultados nos pareceram bem melhores.

Distribuir cerca de 25ml de meio por placa de Petri, 9cm de diâmetro.

b. Caldo Triptose-fosfato

("Tryptose phosphate broth", Difco).

Bacto-Tryptose	20,0
Bacto-Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
K ₂ HPO ₄	2,5
Ágar-ágar (Oxoid nº 3)	1,0

pH final 7,3

Dissolver e distribuir cerca de 5ml por tubo de - 150 x 10mm.

Esterilização 121°C por 15 minutos.

Se o meio não for usado imediatamente após a preparação, deverá ser reaquecido em banho-maria fervente, momentos antes de sua inoculação.

c. Caldo hiperclorotado a 4,0 e a 6,5% (CARLSSON, 1965b)

Extrato de carne (Armour	1,0
Proteose-Peptone nº 3 (Difco)	10,0
Glicose (Carlo Erba)	10,0
Cloreto de sódio (Baker)	
(segundo concentração desejada)	
Vermelho fenol	0,018

pH final 7,4

Dissolver os componentes, distribuir cerca de 5ml em tubos de 150 x 10mm.

Esterilização: 121°C por 15 minutos.

d. Leite-azul-de-metileno a 0,1 e a 0,01% (BUTTIAUX e colab., 1966)

Molico (leite em pó desnatado Nestlé)	105,0
---------------------------------------	-------

pH final 7,0

Seguir a indicação do fabricante para a diluição. - Distribuir cerca de 9ml em tubos de 160 x 16mm.

Esterilização 113°C-115°C durante 20 minutos.

No momento do emprêgo juntar 1ml da solução:

Azul de Metileno (Merck)	0,1 ou 1,0
(de acôrdo com a concentração desejada)	

Água destilada	100,0ml
----------------	---------

Esta solução deve ser esterilizada a 121°C por 20 minutos.

A adição do corante após esterilização tem a vantagem de nos permitir comprovar que não houve caramelização durante o aquecimento, como é necessário.

e. Meio para se verificar a hidrólise do amido (DUNICAN & SEELEY, 1962)

Tryptone (Difco)	10,0
Extrato de lêvedo (Difco)	5,0
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2,0
Amido (Merck)	3,0
Glicose (Carlo Erba)	0,5
Ágar-ágar (Oxoid nº 3)	15,0

pH final 7,0-7,2

Dissolver os componentes, esterilizar a 121°C por 15 minutos, distribuir em placas.

f. Caldo sacarosado a 5% (CARLSSON, 1965b)

Tryptose (Difco)	10,0
Extrato de lêvedo (Difco)	5,0
K ₂ HPO ₄ (Difco)	5,0
Sacarose (Comercial)	50,0

pH final 7,3

Dissolver os componentes, distribuir cerca de 5ml em tubos de 150 x 10mm.

Esterilização: 121°C por 15 minutos.

g. Meio básico para a verificação de hemólise.

1) Infuso de coração de boi. A cada 500g de coração fresco (matança recente, não congelado), livre de tecidos conjuntivo e adiposo, moído, juntar 1.000ml de água destilada, em recipiente de vidro. Deixar em infusão a 4°C até o dia seguinte. Expor ao vapor fluente durante 60 minutos. Filtrar em pano e depois em papel.

2) Ágar-infuso-de-coração-de-boi

Infuso de coração de boi	1.000 ml
Polypeptone (BBL)	10,0
NaCl (Baker)	5,0
Extrato de lêvedo (Difco)	1,0
Ágar-ágar (Difco)	1,5

Dissolver, fundir. Autoclavar a 115°C, 20 minutos.

3) Ágar-sangue

Adicionar de 2,5 a 3% de sangue desfibrinado - estéril de coelho normal ao ágar-infuso-de-coração-de-boi, fundido, resfriado a 45°C.

h. Caldo para se verificar a hidrólise da arginina - (NIVEN e colab., 1942)

Extrato de lêvedo (Difco)	5,0
Tryptone (Difco)	5,0
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2,0
Glicose (Carlo Erba)	0,5
L (+) Arginina (Merck)	3,0

pH final 7,0

Dissolver os componentes, distribuir cerca de 5ml em tubos de 150 x 10mm.

Esterilização: 121°C por 15 minutos.

Reativo de Nessler-Dissolver 50g de KI em cerca de 35cc de água destilada. Adicionar, gôta a gôta, uma solução de HgCl_2 até que persista leve precipitado. Ajuntar 400cc de uma solução a 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 e decantar. Conservar em vidro escuro com rôlha esmerilhada. (BIER, 1957).

i. Meio básico para a fermentação de carboidratos

CTA ("Cystin trypticase agar", BBL)

Cistina (Merck)	0,5
Trypticase (BBL)	20,0
Ágar-ágar (Oxoid nº 3)	3,5
Cloreto de sódio (Baker)	5,0
Sulfito de sódio (Merck)	0,5
Vermelho fenol (Merck)	0,017

pH final 7,3

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

Manitol (Carlo Erba)
Rafinose (Merck)
Inulina (Merck)
Sorbitol (Merck)

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

Dissolver inicialmente 0,5g de cistina, em solução - de 0,5g de carbonato de sódio em 5cc de água destilada a quente; completar o volume a 50cc com água destilada.

Dissolver conjuntamente os demais componentes, distribuir em tubos de 100 x 8mm cerca de 3ml de meio.

Esterilização: 115-118°C (não mais que 12 libras de

pressão) durante 15 minutos. Resfriar o tubo em posição vertical.

Se o meio não fôr usado imediatamente após a preparação deverá ser aquecido em banho-maria fervente, e a seguir - resfriado, momentos antes de sua inoculação.

2.4 - Contagem de colônias, isolamento e conservação dos estreptococos

Ao tubo de homogeneização foi adicionada, quantidades proporcionais ao peso do raspado dental, de solução tampão fosfato 0,067M de pH 7,2 com 0,05% de extrato de lêvedo (HOWELL e colab., 1962; LITTLETON e colab., 1967).

Os tubos de homogeneização foram submetidos aos seguintes procedimentos: agitação por 15 minutos, em agitador rotatório (Walser Automatic Timer Corp. N.Y., N.Y.), logo a seguir submetidos ao vibrador-para-vazar-modelo-de-gesso (Sgai), acionado no ponto "forte", por 5 minutos, tempo que se mostrou suficiente para promover a homogeneização das substâncias do material dental.

A primeira diluição correspondia sempre a 1:4.000, - sendo realizadas ainda mais três diluições decimais, tendo como diluente a referida solução tampão. A seguir 0,1ml da última diluição era semeada na superfície do ágar "Mitis-salivarius", espalhado o "inóculum" com alça de vidro; correspondendo os números dos resultados que referimos (Quadro 5), a unidades viáveis por 1 (um) décimo de miligrama de raspado da placa dental.

As placas de Petri foram incubadas em jarra de fêcho hermético (dessecadores de vidro com capacidade para dez litros), sendo o oxigênio de seu interior consumido quase totalmente por álcool incandescente que umedecia uma peça de papel de filtro grosso, tipo xarope (Kablin) de aproximadamente 3cm de diâmetro (BURROWS, 1965).

As contagens de colônias e simultânea observação dos

tipos de colônias eram efetuadas com o auxílio de microscópio estereoscópico (E. Leitz) aumento de 1 x 12,5 diâmetros. A identificação de origem de cada colônia transplantada foi feita - por um número, (correspondendo ao paciente), outro número com uma chave (correspondendo à fórmula dental para a indicação do dente, e uma letra que correspondia ao tipo de colônia). Por ex.:

1 $\overline{8}$ a significa:

paciente número 1, terceiro molar inferior esquerdo, colônia a.

Afim de ser realizada cobertura total da superfície da placa de Petri na contagem das colônias, foram efetuados - círculos concêntricos na parte externa a partir do centro da placa de Petri, com distância de 2 a 3 cm uns dos outros, e um traço ligando o centro da placa ao lado externo: desta forma - foi evitado, também, contar-se mais de uma vez a mesma colônia.

Transferia-se uma colônia de cada tipo para tubo de caldo triptose-fosfato, adicionado de 0,1% de ágar-ágar, incubando-se por 24 horas.

A conservação das amostras foi feita após homogeneização do tubo de cultura, transferindo-se duas alçadas para tubos de 100 x 8mm que continham 1ml de sangue desfibrinado estéril de coelho normal (ZINSSER & BAYNE-JONES, 1947; SOLÉ-VERNIN, 1960). As culturas foram estocadas à temperatura ambiente, recebendo o tubo uma tampa de borracha esterilizada que, colocada sobre o tampão de algodão, tapava hermeticamente o tubo.

2.5 - Normas para a identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON

Para a identificação bacteriológica, foi transferida uma alçada do tubo de conservação para a superfície do ágar - "Mitis-salivarius", em estrias, obedecendo às mesmas condições de incubação descritas para o isolamento inicial dos germes, - bem como feito reconhecimento do tipo de colônia, com microscó

pio estereoscópico. Uma colônia foi transplantada para o caldo triptose-fosfato; a seguir, incubado por 24 horas.

A partir destes tubos de cultura eram feitas lâminas que, coradas pelo Gram, forneciam informações a respeito da morfologia, agrupamentos bacterianos; e também da presença de contaminantes.

Para a identificação das espécies foram realizadas - provas bioquímicas e também provas de resistência aos agentes inibidores, assim chamados por WAHL & MEYER (1956 a e b).

O "inoculum" que era levado aos meios de provas, foi padronizado, sempre a partir de culturas recentes (24 horas) - que eram previamente bem homogeneizadas por agitação. O diâmetro da alça invariavelmente foi de 4mm.

As 17 diferentes provas de identificação adotadas, - tiveram sua recomendação em trabalhos sobre a identificação de estreptococos alfa e gama-hemolíticos por diversos autores: - (SHERMAN, 1937; SHERMAN e colab., 1943; MIRICH e colab., 1944; GRINI, 1948; WILLIAMS & HIRCH, 1950; SWIFT, 1952; WILSON & MILES, 1955; WAHL & MEYER, 1956a,b; SOLÉ - VERNIN & ARAUJO, 1957; BREED e colab., 1957; WILLIAMS, 1958; PAPAVALASSILOU, 1962; DEIBEL, 1964; WILSON & MILES, 1964; CARLSSON, 1965b e 1967a).

Elas foram as seguintes:

1. Colônias mucóides ou não, em ágar hipersacarosado;
2. Bile solubilidade;
3. Catalase;
4. Hemólise, por plantio em profundidade ("pour plate");
5. Viscosidade ou não, em caldo sacarosado a 5%;
6. Precipitação densa ou não, com a adição de 1 parte, e de 3 partes de etanol (99,5%), ao caldo sacarosado à 5%;
7. Crescimento ou não, em 4,0 e a 6,5% de NaCl;
8. Crescimento ou não, em 0,01 e 0,1% de leite-azul-de-metileno;
9. Hidrólise ou não, da arginina;

10. Hidrólise ou não, do amido (realizada para os dextrana-positivos);
11. Fermentação ou não, da Inulina;
12. Fermentação ou não, da Rafinose;
13. Fermentação ou não, do Manitol;
14. Fermentação ou não, do Sorbitol.

A rigor, os estreptococos encontrados em placas dentais não requerem número elevado de provas para sua identificação, como pode ser apreciado nos trabalhos de KRASSE (1966), - GIBBONS e colab. (1966), CARLSSON (1961a) e STOPPELAAR (1967).

Como norma geral para a realização das provas de identificação (bioquímicas e de resistência aos agentes inibidores) foram seguidos os seguintes pontos:

- a) Meios de cultura de preparo recente;
- b) Leituras finais nunca antes de dois dias, ou após cinco, para os resultados negativos;
- c) Quando o crescimento fazia supor contaminação, foram realizadas colorações de Gram e replantio em ágar "Mitis-salivarius".

Como norma para a realização das provas de fermentação foram seguidos os seguintes pontos:

- a) Tempo de incubação prolongado até três semanas, no caso de reações negativas;
- b) Para evitar dessecação dos meios de cultura, colocou-se, no interior da estufa, uma bandeja de 30 x 50cm contendo água, fornecendo pois, ampla superfície de evaporação e saturando de umidade o interior.
- c) Quando a amostra, por características previamente conhecidas, era suspeita de fermentação de substrato com valor diferencial, mas não a apresentava (Por ex.: sorbita ou manita) repicávamos dêsse tubo negativo para outro de igual substrato, na hipótese de que enzimas adaptativas viessem, então, se revelar pelo contato com o substrato-prova, como acontece com ou-

tras bactérias logo após o isolamento (por ex. o meningococo, - com relação ao manitol).

d) A pureza final das culturas foi sistematicamente - verificada em todos os casos de fermentação, quer através do plantio em ágar "Mitis-salivarius", quer por lâmina ao Gram.

2.6 - Descrição das provas de identificação

1. Colônias mucóides em ágar hipersacarosado.

O meio utilizado foi o próprio ágar "Mitis-salivarius".

Os tipos de colônias observadas são descritos no Capítulo 4, RESULTADOS. Para uma observação mais minuciosa das colônias foram elas examinadas ao microscópio estereoscópico, e com toques de uma alça de platina de ponta afilada.

2. Bile-solubilidade.

Foi feita transferindo-se 1ml de cultura do caldo - triptose-fosfato com 0,1% de ágar-ágar para cada um de dois tubos de 100 x 8mm, estéreis; um deles recebeu duas gotas de bile de boi estéril e outro ficou para o controle. As leituras foram efetuadas após 1 e 24 horas.

3. Hemólise, frente a hemácias de coelho.

Plantio em profundidade ("pour plate"): Distribuir aproximadamente 8ml de ágar-sangue (V. acima), enquanto fluido, - a pequenas placas de Petri (5,5cm de diâmetro) nas quais, respectivamente, se colocaram pequenos inóculos das culturas em - caldo. Misturar com movimentos rotatórios horizontais da placa sobre a mesa. Incubar a 37°C durante 24 horas. Deixar esfriar à temperatura ambiente, antes de examinar ao microscópio (aumento, por ex., de cerca de 45 diâmetros).

4. Catalase

Esta prova foi realizada colocando-se 2 gotas de água oxigenada, a 10 volumes, sobre as colônias diretamente no ágar "Mitis-salivarius"; o desprendimento de oxigênio evidenciava a presença de catalase.

5. Viscosidade em meio hipersacarosado.

O meio empregado foi o de NIVEN e colab., (1946) com ligeiras modificações de CARLSSON, (1965b). Os resultados foram lidos após uma semana. A viscosidade do meio inoculado foi comparada com um controle estéril através de ligeiras agitações de ambos. A gelificação, às vezes, chegou a atingir o estado semi-sólido.

6. Precipitação com a adição de 1, e de 3 partes de etanol, ao caldo hipersacarosado.

Cerca de 1ml da cultura em caldo hipersacarosado era transferido a um tubo de 100 x 8mm sendo adicionado de 1ml de álcool etílico (99,5%); após agitação, o tubo era colocado num suporte, e a precipitação flocular observada alguns minutos depois.

Para a precipitação, com 3 partes de etanol, o mesmo procedimento foi adotado (3cc de etanol + 1cc da cultura).

7. Meios hipercloretados

A prova de crescimento com a percentagem de 4% foi efetuada para todos os germes; na percentagem de 6,5% somente para os casos positivos na prova anterior. Leituras após três, e cinco dias.

8. Crescimento em leite com azul de metileno

De modo similar ao anterior, foram usadas duas percentagens 0,01% e 0,1% de azul de metileno em leite. Foi utilizada inicialmente a menor concentração, e nos casos positivos para esta, foi feita a prova com 0,1%. As leituras foram efetuadas - após dois dias de incubação como propõem WAHL & MEYER (1956a).

9. Produção de amônia a partir da arginina

O método utilizado foi o de NIVEN e colab., (1942). - Após 3 dias de incubação, quando razoável turvação deve ocorrer, cerca de 0,5ml da cultura eram transferidos a um pequeno tubo - de 100 x 8mm, a que se adicionavam duas ou três gotas do reati-

vo de Nessler. O aparecimento de coloração marrom (tijolo) indicava a presença de amônia na cultura. Tendo ocorrido, pois, hidrólise da arginina.

10. Hidrólise do amido

As bactérias são semeadas em determinado ponto da placa de ágar, que é incubada por três dias. A hidrólise do amido é revelada colocando pequena quantidade de Lugol.

Prova realizada apenas para os produtores de dextrana.

11. Provas de fermentação de carboidratos

O meio básico utilizado foi o ágar-cistina-tripticase (CTA, "Cystin trypticase agar", BBL). Sendo os tubos, onde ocorreram viragens do indicador de pH de vermelho para amarelo, considerados como positivos. As normas seguidas para estas provas já foram descritas anteriormente. Nenhuma destas provas foi considerada negativa senão quando havia bom crescimento da amostra. É interessante registrar que, quando o carboidrato não era fermentado, o meio se mostrava adequado para a conservação dos estreptococos por mais de um mês.

2.7 - Ensaio prévio dos meios de cultura e das provas de identificação

Tôdas as provas realizadas na identificação das amostras isoladas foram previamente ensaiadas e padronizadas com o emprego de germes de resultados conhecidos (culturas-padrão).

Essas culturas-padrão foram as seguintes:

Recebidas por cortesia do Dr. ZINNER (AHT, BHT e CHT).

Recebidas do Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz".

Streptococcus salivarius

Streptococcus faecalis, var. liquefaciens

Todos os meios básicos, confeccionados, foram ensaiados previamente para se saber de sua adequabilidade ao crescimento das nossas amostras.

Capítulo 3

RESULTADOS

Descrição dos tipos de colônias. Comentários aos resultados em si próprios. Identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON.

Examinaram-se 27 superfícies dentais dos 12 pacientes em observação, por meio de raspagens com cureta, obtendo-se material de 26 que, sendo semeados, deram culturas de estreptococos em todos, num total de 81 amostras (1 a 5 para cada raspado) por se ter transplantado uma colônia de cada tipo no ágar "Mitis-salivarius" de contagem.

3.1 - Descrição dos tipos de colônias

Grupo I - (Str. sanguis) (Fig. 2). Colônias lisas ou rugosas com tamanho variável entre 0,5 à 1,5mm, que tendem a formar "zooglêias" de firme consistência e que apresentam, na superfície do ágar "Mitis-salivarius", certa aderência que chega a deformá-lo. Frequentemente se tornam tão endurecidas e presas à superfície do meio que é impossível removê-las daí com a alça de platina, havendo necessidade de se retirar fragmentos dêste. Ocasionalmente, a existência de material mucóide determina o acoplamento que pode ser observado em colônias próximas; as colônias, entretanto, quando bem separadas, perdem esta ca-

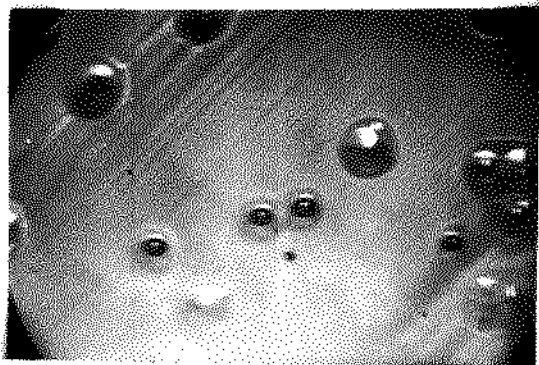
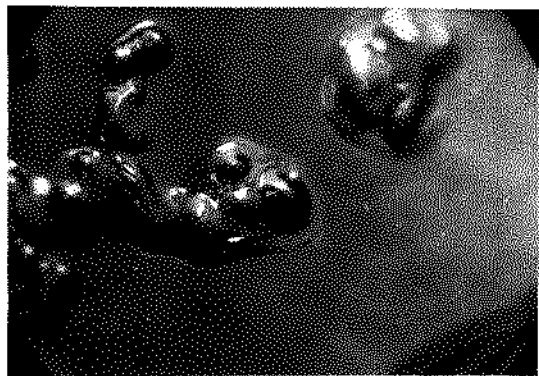
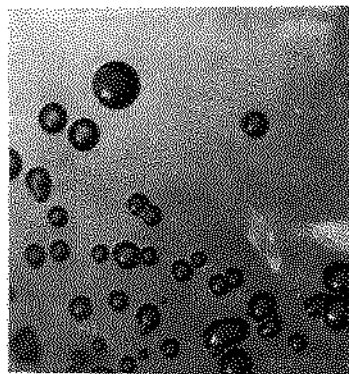
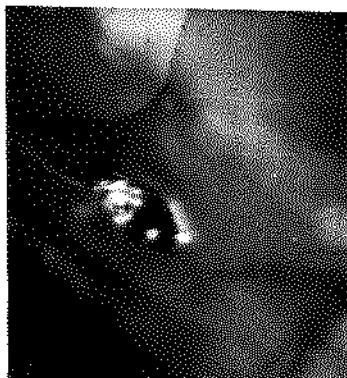
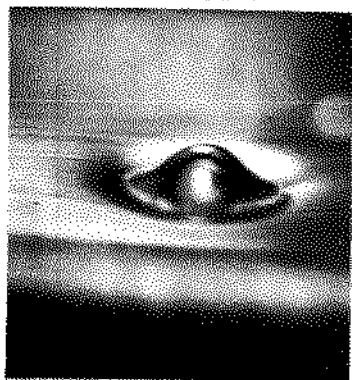


Fig. 2 - Colônias de estreptococos do Grupo I, (Str. sanguis) cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 36 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros (Fotos do A.).

a.b. Colônias lisa (a) e rugosa (b) demonstrando deformação da superfície do meio de cultura e sugerindo aderência a ele o que de fato se verifica.

c. Colônias apresentando acoplamento entre as mais próximas, enquanto as outras mais separadas são totalmente secas. Amostra (11 8 | b).

d.e. Grande quantidade de polissacarídeo acoplado as colônias que se apresentam como se estivessem no interior de uma piscina. Amostra (d. 12 8 | c). (e. 5 8 | c).

racterística. Em outras ocasiões a existência dêste material mucoide persistia, dando a impressão que a colônia estava no centro de uma piscina, idênticamente às observações de ZINNER e colab. (1965 a,b) com amostras AHT.

No caldo sacarosado a 5%, apresentam crescimento homogêneo, raramente com sedimentação de germes e, de modo invariável, viscosidade que se manifesta de maneira similar à adição de pequenas quantidades de ágar-ágar que torna o meio semi-sólido. A adição de uma parte de etanol a essa cultura, determina formação de denso precipitado flocular; com três partes de etanol, tivemos precipitado somente em alguns casos.

Grupo II - (Str. mutans) (*) (Fig. 3). Colônias finamente granulares, de aspecto rugoso como pequenas mórulas; tamanho intermediário entre 0,5 a 1,0mm de diâmetro, altamente convexas com bordos irregulares. A coloração na luz refletida é cinza claro azulado e opaco. Com freqüência as colônias apresentavam uma gotícula cintilante de polissacarídeo no tópo; entretanto, em algumas delas, somente os primeiros caracteres foram notados, ocorrendo, às vezes, na parte central da colônia, leve depressão(*).

Estas colônias deram, em sua totalidade, frente às provas de identificação, as mesmas características.

No caldo hipersacarosado apresentaram, após três dias, viscosidade moderada que originou precipitado denso com a adição de uma parte de etanol. Com três partes de etanol, o precipitado foi discreto.

(*) A última edição do MANUAL DE BERGEY (BREED e colab 1957) já não menciona mais esta espécie. Mantemos o nome a exemplo do que fazem investigadores atuais (CARLSSON, 1967a e 1967b)

(**) Como se sabe, uma cultura mesmo que pura se semente em placa, não dá necessariamente, tôdas as colônias idênticas em aspecto. Haja visto, por ex., o que ocorre com os estreptococos beta-hemolíticos e os bacilos diftéricos dos tipos gravis, -mitis e intermedius, sendo considerado típico o aspecto dominante.

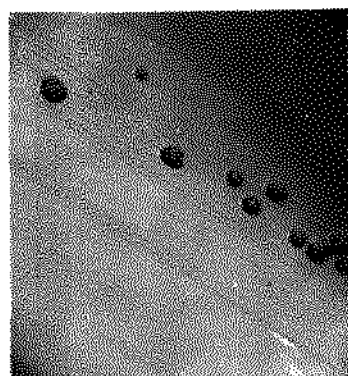
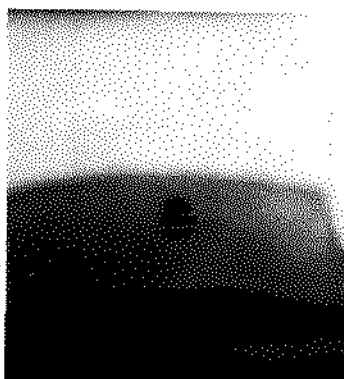
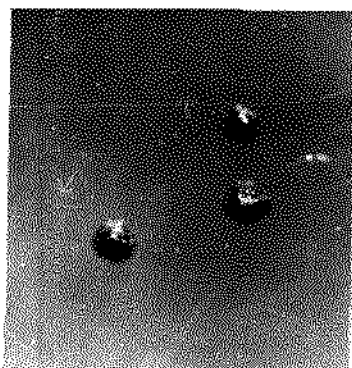
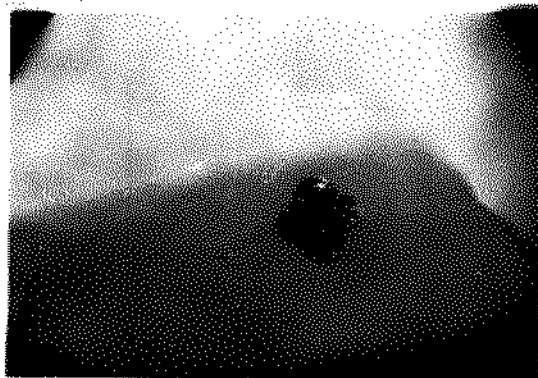
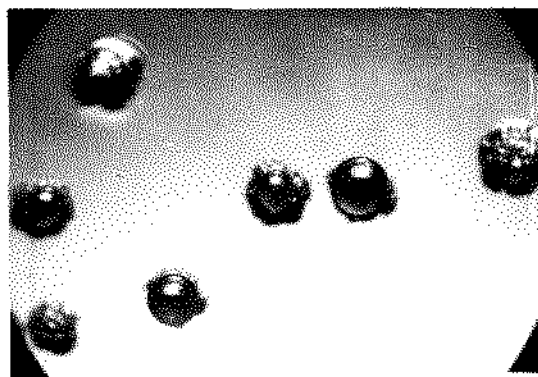


Fig. 3 - Colônias de estreptococos do Grupo II, (Str. mutans) cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 24 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros. (Fotos do A.).

a. Demonstração de gota de polissacarídeo no t^opo da colônia. Projeção vertical, amostra (10 | 8 b).

b. Demonstração da presença da gota de polissacarídeo no t^opo da colônia, projeção lateral, verificando-se, ainda, re flexo quase perfeito da colônia na superfície lisa especular do meio de cultura. Amostra (10 | 8 b).

c. Colônias sem gotícula de polissacarídeo. Projeção vertical. Amostra (5 | 8 d).

d. Idem, projeção bem lateral. Amostra (5 | 8 d).

e. Projeção semi-lateral, sem gotícula de polissacari deo. Amostra (4 | 8 d).

Grupo III - (Str. salivarius) (Fig. 4). Colônias caracterizadas pelo seu grande tamanho, chegando até 7mm de diâmetro, altamente convexas, azuis claras. A princípio são lisas e brilhantes; após alguns dias perdem o brilho: e a rugosidade, que se inicia pela base, generaliza-se. Determinam um crescimento - no caldo hipersacarosado com formações de flóculos; a precipitação após a adição de etanol se verifica, principalmente, com - três partes.

Grupo IV - (Str. sp) (Fig. 5). Colônias lisas, circulares, com diâmetro entre 1 a 3mm, coloração próxima ao marron e ao preto, consistência butirosa, convexa, mas ocasionalmente, com centro saliente, bordos inteiros, ou levemente ondulados.

Em caldo sacarosado a 5% apresentam crescimento homogêneo, sem precipitações. Ausência total de viscosidade, bem como a de precipitado com uma, ou três partes de etanol.

Grupo V (*) - (Str. mitis, etc.) (Fig. 6). Colônias - cujas características culturais no ágar "Mitis-salivarius" podem possibilitar confusões com as dos Grupos II e IV. Coloração variável em torno do azul escuro. Seu pequeno porte é um dos fatôres de evitar confusões.

No caldo sacarosado a 5%, não é observada viscosidade nem precipitados com a adição de etanol.

3.2 - Comentários aos resultados em si próprios

Antes de estabelecermos um confronto entre nossos resultados e os de outros investigadores, acreditamos ser conveniente tecer algumas considerações em torno da metodologia empregada, devido a algumas modificações de técnica adotadas no presente trabalho.

Apesar de KRASSE (1966), CARLSSON (1967a) e DE STOPPE LAAR (1967) cultivarem as bactérias em condições anaeróbicas -

(*) É interessante notar que neste Grupo são incluí-- das amostras semelhantes ao que se entende por Str. mitis - (CARLSSON, 1967a).

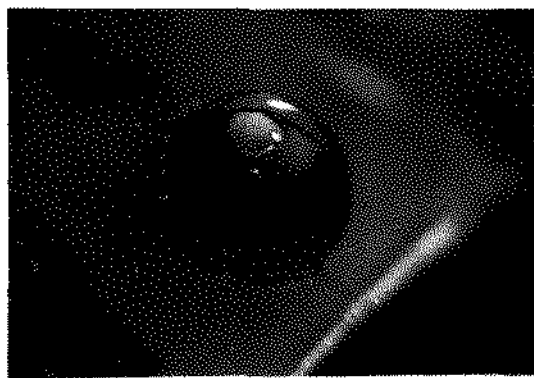


Fig. 4 - Colônia de estreptococos do Grupo III (Str. salivarius) cultivadas em ágar "Mitis_salivarius" por 48 horas a 37°C. Aumento de 42 diâmetros. Observa-se o reflexo da lâmpada na superfície da colônia. Amostra (13 8| a) (Foto do A.).

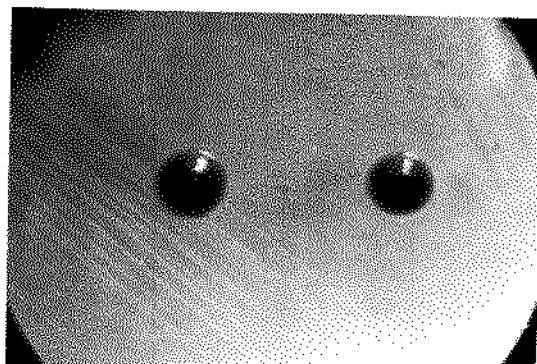
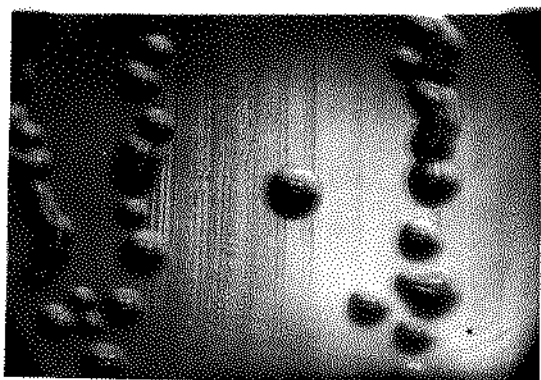


Fig. 5 - Colônias de estreptococos do Grupo IV, (Str. sp.) cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 24 horas a 37°C . Aumento de 42 diâmetros. Amostras (a 9 | 8 a) (Fotos do A.).

a.b. Colônias cujas superfícies se apresentam lisas e brilhantes, nela refletindo-se três orifícios das objetivas - que foram retiradas para melhor iluminação, e também a objetiva utilizada na fotografia.

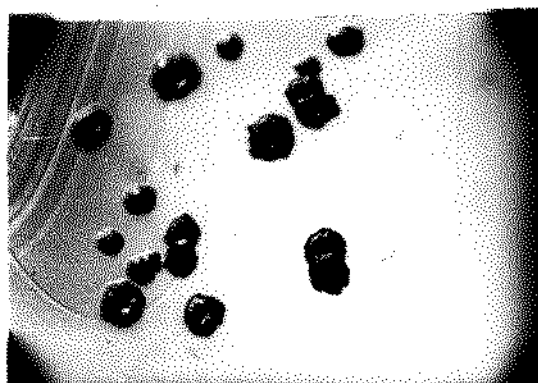


Fig. 6 - Colônias de estreptococos do Grupo V, (Str. mitis, etc) cultivadas em ágar "Mitis-salivarius" por 36 horas a 37°C . Aumento de 42 diâmetros. Amostra(7 | 8 | c) (Foto do A.).

(95% de N e 5% de CO₂), obtivemos resultados satisfatórios empregando a técnica descrita em Material e Métodos.

Para a conservação das amostras, como já exposto, foram elas semeadas em sangue estéril desfibrinado de coelho normal, - os tubos tapados com rôlha de borracha (hermeticamente) e guardados à temperatura ambiente. Embora alguns autores recomendem que sejam guardadas a -20 a -30°C (temos mais de 30 amostras guardadas nessas condições), o processo por nós adotado, mostrou-se suficiente para manter as amostras (alfa-gama-hemolíticas) com vida por 6 meses, o que está de acordo com os achados de SOLÉ-VERNIN (1960). É pertinente registrar que, várias das amostras extintas no período de conservação, o foram de tubos em que havia contaminação com fungos (ação antibiótica ?), infelizmente frequente em nosso laboratório.

Por outro lado, numerosos são os trabalhos que evidenciam a inconstância das reações fisiológicas dos estreptococos, mais especificamente dos alfa-gama-hemolíticos, apesar de padronização de técnicas; obviamente originando uma série de dificuldades.

Salienta MIRANDA (1965) "Apesar de terem sido descritas, amostras que foram consideradas como representativas de espécies pelos seus autores, as dúvidas, quanto a possibilidade de se classificarem os estreptococos do grupo Alfa-gama de modo preciso, persistem até hoje, a ponto de WILSON & MELLES, (1964), - não considerarem aceitáveis as denominações que se poderiam impor às amostras submetidas às conhecidas provas bioquímicas".

Com base estabelecida em 17 diferentes provas de identificação, recomendadas por CARLSSON, (1965b e 1967a), (Capítulo 2 Material e Métodos), procuramos enquadrar nossas amostras num dos cinco Grupos estabelecidos por CARLSSON (1967a), que permite moderadas variações de comportamento dos estreptococos dentro de um mesmo grupo (sub-grupos).

Para a identificação inicial o ágar "Mitis-salivarius"

foi utilizado, a exemplo de KRASSE (1953, 1954); FITZGERALD & KEYES (1960); KRASSE (1966) e CARLSSON (1965b e 1967a). Fornece resultados claros que nos permitem, com segurança, estabelecer uma contagem bacteriana dos diferentes Grupos, pelos tipos de colônias que produzem, mesmo antes de completamente identificados.

Efetivamente, é interessante ressaltar, que MIRANDA (1965), dentre 27 provas diferentes empregadas, apenas a liquefação ou não da gelatina, a produção ou não de colônias mucóides - em ágar com 5% de sacarose, mostram invariável reprodutibilidade. Esta constância quanto ao ágar hipersacarosado, ou mais especificamente quanto ao ágar "Mitis-salivarius", que é um meio hipersacarosado especial, foi comprovada inúmeras vezes durante a realização deste trabalho.

Encontramos também grandes dificuldades na leitura do crescimento ou não em ágar-sangue-bileado a 10 ou 40%; se minuciosamente examinadas, a totalidade das amostras cresciam em ambas as concentrações. As dúvidas foram acentuadas em marcar um limite para as que seriam negativas; apesar de realizadas para todos os germes estas provas não foram incluídas nas nossas considerações.

Foi salientado ainda (V. Material e Métodos) que, quando ocorria que certas amostras, por características prévias, deviam atacar certos substratos mas se mostravam negativas, fizemos repiques sucessivos para o mesmo substrato na esperança de fazer agir os enzimas adaptativos, o que de fato ocorreu algumas vezes. Com 35 amostras sobreviventes, fizemos a verificação da hemólise frente a hemácias de coelho, tendo verificado que, em geral, produzem hemólise alfa muito discreta, às vezes, alfa + h também discretos, ou gama.

Por fim, chamamos a atenção para o fato de que os resultados da contagem de partículas ou unidades viáveis, quando se aplica a estreptococos, dependem muito, entre outros fatores, do método de homogeneização empregado, que dará número maior ou menor, de acordo com sua maior ou menor capacidade de desintegra--

ção das cadeias.

3.3 - Identificação dos Grupos de estreptococos de CARLSSON

A identificação dos Grupos I e II, não apresentou dificuldades, pois a própria identificação inicial no ágar "Mitis-salivarius", não raramente, fornecia evidências claras e definitivas destes grupos.

Segundo CARLSSON (1967a), os estreptococos do Grupo I podem ser considerados como semelhantes ao Str. sanguis.

Os estreptococos do Grupo II são os de identificação - mais segura, não somente pela morfologia facilmente reconhecida, encontrada nas provas fisiológicas de identificação. São semelhantes aos "indutores de cárie" descritos por KRASSE (1966), assim confirmados por CARLSSON (1967a) que também os chama de Str. mutans (CLARKE, 1924).

Os estreptococos do Grupo III, embora ocorrendo somente em um dos nossos pacientes, (cuja observação não se pôde completar) não apresentou dificuldades de identificação, pela formação de colônias mucóides de grande porte em ágar "Mitis-salivarius", como descrito por CHAPMAN (1946) confirmado por KRASSE (1953 - 1954a e b) e CARLSSON (1965a e 1967a) sendo tidas como Str. salivarius.

O Grupo IV é facilmente reconhecido no ágar "Mitis-salivarius", e apresenta propriedades bioquímicas bem características. Pela falta de habilidade em fermentar os carboidratos usados, estas amostras não puderam ser consideradas como representativas de nenhuma espécie.

O Grupo V, dado o tamanho e características morfológicas de suas colônias e variabilidade nas reações bioquímicas, - mostra-se muito heterogêneo. Segundo CARLSSON (1967a) algumas amostras podem ser consideradas como Str. mitis.

Os enterococos não foram observados em nenhuma ocasião, pois nenhuma amostra cresceu em 6,5% de NaCl.

Os estreptococos do Grupo lactis também não foram encontrados, pois nenhuma amostra cresceu em leite com 0,1% de azul de metileno.

Por outro lado, os nossos dados não permitem estabelecer similaridade entre qualquer dos dois grupos produtores de dextranas (GR. I e II) e o Str. bovis, como propuseram DE STOPPELAAR e colab. (1967), para os estreptococos do Grupo II (Str. mutans).

Submetemos à prova da hemólise mais de 30 amostras que sobreviveram à conservação na forma descrita em Material e Métodos.

Obtivemos resultado alfa geralmente pouco, ou mesmo tão pouco, que se perguntaria se não é gama. Às vezes, obtivemos o que os franceses chamam de alfa + h, isto é, além da hemólise parcial esverdeada junto à colônia, um halo de hemólise total por fora, - estreito, circundando o halo esverdeado. Não encontramos nenhum - beta. Os sub-Grupos Vc, Ve e Vf não puderam ser examinados por falta de amostra sobrevivente.

Quadro 1 - Legenda geral para os Quadros

Col.	Colônias
MSA	Ágar "Mitis-salivarius"
R	Colônia Rugosa
L.	Colônia Lisa
Pp.	Precipitado
Cresc.	Crescimento
Az. Met.	Azul de Metileno
.	Provas não feitas
+	Provas positivas
+	Provas na maioria positivas
-	Provas negativas
-	Provas na maioria negativas
<u>8</u>	Fórmula dental, 3º molar superior direito
<u>8</u>	Idem, Ibidem esquerdo
<u>8</u>	Idem, Ibidem direito
<u>8</u>	Idem, Ibidem esquerdo

Quadro 2 - Critérios taxonômicos na classificação de estreptococos nos Grupos de CARLSSON

Grupos	Grupo I							Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V				
Espécies prováveis	(Str.sanguis)							(Str.mutans)	(Str.salivarius)	(Str.sp)	(Str.mitis, etc)				
Variedades	Ia	Ib	Id	If	Ig	Ig	Ii				Va	Vb	Vc	Ve	Vf
Provas realizadas															
Tipo de col.no MSA.	L.R.	L.R.	L.R.	L.R.	L.R.	L.R.	L.R.	R.	L.	L.	L.	L.	L.R.	L.	L.
Bile solubilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólise	de modo geral, alfa-hemolíticas														
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)															
a. Uma parte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
b. Três partes	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise da arginina	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Hidrólise do amido (**)	+	+	+	+	+	+	+	-	.	.	.	.	.	.	+
Fermentação:															
a. Inulina	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
b. Rafinose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
c. Manitol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
d. Sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(*) Seguimos, na organização geral desta tabela, as diretrizes da similar de CARLSSON (1967a). Legenda Quadro 1.

Foram emitidos os subgrupos Ic e Ie; Vd, Vg e Vi porque não ocorreram em nossos achados.

(**) Prova realizada somente para os Grupos I e II (produtores de dextrana).

Quadro 3 - Distribuição da frequência, nos Grupos de CARLSSON, de 81 amostras de estreptococos isoladas de 27 placas dentais.

Grupos de CARLSSON (1967a)	N	%
Grupo I (<u>Str. sanguis</u>).....	38	47%
Grupo II (<u>Str. mutans</u>).....	9	11%
Grupo III (<u>Str. salivarius</u>)....	0	0%
Grupo IV (<u>Str. sp.</u>).....	23	28%
Grupo V (<u>Str. mitis</u> , etc.)...	11	14%
TOTAL	81	100%

Quadro 4 - Enquadramento, nos Grupos de CARLSSON, das 81 amostras de estreptococos isoladas de 27 placas dentais de 12 pacientes, segundo comportamento nas provas de identificação bacteriológica. (*)

Grupos Espécies Numero de amostras	I	II	IV	V
	(<u>Str.sanguis</u>)	(<u>Str.mutans</u>)	(<u>Str.sp.</u>)	(<u>Str.mitis</u> , etc.)
Provas	38	9	23	11
Col.Lisa no MSA.	18/38	0/9	23/23	4/11
Col.Rugosa no MSA.	20/38	9/9	0/23	7/11
Bile solubilidade	0/37(**)	0/6(**)	0/23	0/11
Hemólise	V. texto			
Catalase	0/37	0/6	0/23	0/11
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	37/37	6/6	0/23	0/11
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)				
a. Uma parte	37/37	6/6	0/23	0/11
b. Três partes	11/37	5/6	0/23	0/11
Cresc.em 4% de NaCl	2/37	6/6	0/23	0/11
Cresc.em 6,5% de NaCl	0/37	0/6	0/23	0/11
Cresc.em 0,01% Az.Met.	1/37	0/6	0/23	0/11
Cresc.em 0,1% Az.Met.	0/37	0/6	0/23	0/11
Hidrólise da arginina	18/37	0/6	6/23	4/11
Hidrólise do amido	33/37	0/6	.	.
Fermentação:				
a. Inulina	18/37	6/6	0/23	2/11
b. Rafinose	25/37	6/6	0/23	6/11
c. Manitol	3/37	6/6	0/23	0/11
d. Sorbitol	9/37	6/6	0/23	0/11

(*) Legenda no Quadro I

Frações:nº de amostras positivas/nº de amostras submetidas à prova.

(**) Devido à extinção de culturas nos tubos de conservação não pudemos realizar as provas bioquímicas de 4 (quatro) amostras.

Quadro 5 - Distribuição da freqüência dos Grupos de estreptococos de CARLSSON com contagens de suas unidades viáveis, em 27 placas dentais de 12 pacientes: índice - CPO-S na ocasião; e exame clínico desses locais 6 meses após o exame bacteriológico (*)

Pacientes	GRUPOS DE ESTREPTOCOCOS (**)				Índice CPO-S inicial	Exame clínico após 6 meses
	Grupo I (<u>Str.sanguis</u>)	Grupo II (<u>Str.mutans</u>)	Grupo IV (<u>Str.sp.</u>)	Grupo V (<u>Str.mitis</u> , etc.)		
1 <u>8</u>	60x10 ⁷		88x10 ⁷		6	íntegro
1 <u>8</u>	8x10 ⁷		24x10 ⁷		6	íntegro
2 <u>8</u>		140x10 ⁷	12x10 ⁷		29	<u>CÁRIE</u>
2 <u>8</u>		168x10 ⁷	340x10 ⁷		29	<u>CÁRIE</u>
3 <u>8</u>	4x10 ⁷			16x10 ⁷	3	íntegro
3 <u>8</u>			16x10 ⁷	12x10 ⁷	3	íntegro
4 <u>8</u>	596x10 ⁷	64x10 ⁷	95x10 ⁷	44x10 ⁷	40	<u>DESCOLORAÇÃO</u>
4 <u>8</u>	980x10 ⁷	360x10 ⁷	20x10 ⁷	56x10 ⁷	40	<u>DESCOLORAÇÃO</u>
5 <u>8</u>	340x10 ⁷	160x10 ⁷	36x10 ⁷		35	<u>CÁRIE</u>
5 <u>8</u>	68x10 ⁷		40x10 ⁷		35	íntegro
5 <u>8</u>	188x10 ⁷		124x10 ⁷		35	<u>DESCOLORAÇÃO</u>
5 <u>8</u>	28x10 ⁷				35	íntegro
6 <u>8</u>			16x10 ⁷		9	íntegro
6 <u>8</u>			4x10 ⁷		9	íntegro
7 <u>8</u>	440x10 ⁷		8x10 ⁷	4x10 ⁷	36	íntegro
7 <u>8</u>	1280x10 ⁷		32x10 ⁷		36	íntegro
8 <u>8</u>	492x10 ⁷	12x10 ⁷ (***)	416x10 ⁷		26	íntegro
8 <u>8</u>	72x10 ⁷ (****)	28x10 ⁷ (***)	36x10 ⁷	16x10 ⁷	26	íntegro
9 <u>8</u>	328x10 ⁷		48x10 ⁷		21	íntegro
9 <u>8</u>	80x10 ⁷		12x10 ⁷		21	íntegro
9 <u>8</u>	300x10 ⁷		104x10 ⁷		21	íntegro
10 <u>8</u>		28x10 ⁷		4x10 ⁷	28	<u>DESCOLORAÇÃO</u>
10 <u>8</u>			4x10 ⁷	4x10 ⁷	28	íntegro
11 <u>8</u>	120x10 ⁷		20x10 ⁷	580x10 ⁷	38	íntegro
11 <u>8</u>	140x10 ⁷		20x10 ⁷	800x10 ⁷	38	íntegro
12 <u>8</u>	Não foi possível obter material				26	íntegro
12 <u>8</u>	324x10 ⁷	304x10 ⁷ (***)	52x10 ⁷		26	<u>CÁRIE</u>

(*) Legenda no Quadro I. Unidade ou partículas viáveis por 0,0001g de raspado.

(**) O Grupo III (Str.salivarius) não foi encontrado em nenhum dos 27 raspados.

(***) Não realizadas provas bioquímicas por extinção da cultura no período de conservação.

(****) Deste total, 12x10 do subGrupo não foram examinadas, pelo mesmo motivo anterior.

Capítulo 4

DISCUSSÃO

A flora da boca. Dextrana e sacarose. Inquérito sobre a causalidade, a patogenicidade e o saprofitismo, com vistas às amostras de estreptococos, isoladas de locais em que se produziu cárie. Lactobacilos e cárie dental. Prevenção da cárie.

4.1 - A flora da boca

Há trabalhos mostrando que a flora da cavidade oral não é homogêneamente distribuída por tôdas as porções anatômicas. Assim, na placa dental e na lesão cariiosa, encontram-se estreptococos produtores de dextrana, mas não na saliva; já na saliva, a frequência maior é, incontestavelmente, a de Str. salivarius (assim como também dos lactobacilos). A verificação de estreptococos da cavidade oral tem sido objeto de estudo de investigadores patrícios (SOLE-VERNIN & ARAUJO, 1957; LOURO FILHO, 1957; MIRANDA, 1965; BARBOSA & ARAUJO, 1968).

Nossos exames bacteriológicos de raspados dentais revelaram a existência dos quatro Grupos de estreptococos de CARLSON que habitualmente se encontram nas superfícies dentais; O Grupo III (Str. salivarius) apareceu apenas numa ocasião, num caso que eliminamos de nossa casuística por termos perdido contac-

to com o paciente (Quadro 3).

4.2 - Dextrana e Sacarose

Os estreptococos do Grupo I (Str. sanguis), pelos dados obtidos em nossos estudos, se revelaram importantes constituintes das placas dentais. O Quadro 6 (coluna 5) evidencia que, de fato eles estão presentes em 70% dos raspados dentais examinados (19 dos 27). Estes dados coincidem com os de CARLSSON - (1965b, 1967a); a capacidade desses estreptococos e dos do Grupo II (Str. mutans) de produzirem dextrana (polissacarídeo extra-celular) a partir de sacarose, esclarece porque a freqüente ingestão desse açúcar determina um aumento da quantidade de placas dentais (CARLSSON & EGELBERG, 1965).

Atualmente, já existem muitos trabalhos que evidenciam a importância da sacarose em relação à placa e à cárie dental, - porém é clássico citar que KRASSE (1965a, 1965b) demonstrou que era impossível produzir placas e induzir cáries em "hamsters" inoculados com estreptococos cariogênicos, sem que na dieta figurasse a sacarose.

A esse respeito não podemos ter uma estimativa sistematizada por trabalharmos com pacientes dentro de uma normalidade dietética geral, respeitando seus hábitos e costumes. Pudemos, porém, constatar em dois casos (Quadro 4, pacientes n^{os} 3 e 6) onde havia baixa ingestão de sacarose, principalmente entre as refeições, fato interessante: como não obtivemos material dos raspados dentais nas primeiras tentativas, recomendamos-lhes que ficassem sem escovar seus dentes por alguns dias, quando então, obtivemos grande quantidade de material. Os exames bacteriológicos revelaram, entretanto, baixo número de estreptococos e quase isenção de amostras formadoras de dextrana, demonstrando pois, que o acúmulo era devido à matéria alba.

É possível que a capacidade de sintetizar dextrana seja a característica comum entre as amostras de estreptococos cariogênicos. Este polissacarídeo tem sido detectado em meios hi-

Quadro 6 - Prognóstico da placa: Distribuição da frequência dos Grupos de estreptococos de CARLSSON em 27 placas dentais de 12 pacientes, e sua correlação, a longo prazo (6 meses) com relação à cárie (4 cáries e à descoloração do esmalte (4 descolorações).

ESPÉCIES	Causalidade ?		Patogenicidade ?			Saprophytismo?	OBSERVAÇÕES
	(1) cárie	(2) descoloração	(3) cárie	(4) descoloração	(5) Cárie + descoloração	(6) Presença nas placas	
Grupo I (<u>Str.sanguis</u>)	2/4 (50%)	3/4 (75%)	19/2 (11%)	19/3 (16%)	19/2+3 (27%)	19/27 (70%)	Participante como acidogênico ?
Grupo II (<u>Str.mutans</u>)	4/4 (100%)	3/4 (75%)	9/4 (44%)	9/3 (33%)	9/4+3 (77%)	9/27 (33%)	A mais provável patogenicidade. Índice de patogenicidade total, distintamente superior às demais.
Grupo IV (<u>Str.sp.</u>)	4/4 (100%)	3/4 (75%)	23/4 (17%)	23/3 (13%)	23/4+3 (30%)	23/27 (85%)	Participante como acidogênico ?
Grupo V (<u>Str.mitis</u> , etc.)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	10/0 (0%)	10/3 (30%)	23/3+4 (30%)	10/27 (37%)	Não Participante, na cárie.

Colunas:

- (1) N° de cáries em que esteve presente/N° total de cáries observadas.
- (2) N° de descolorações em que esteve presente/N° total de descolorações observadas.
- (3) N° de placas em que esteve presente/N° de cáries em que esteve presente.
- (4) N° de placas em que esteve presente/N° de descolorações em que esteve presente.
- (5) N° de placas em que esteve presente/N° total de cáries + descolorações em que esteve presente.
- (6) N° de placas em que esteve presente/N° total de placas examinadas.

persacarosados, sólidos ou líquidos, por diversos autores. FITZGERALD e colab. (1960) descreveram colônias consistentes, de consistência semelhante à da borracha (amostra FA-1, em ágar-sacarose). ZINNER e colab. (1965a) descreveram contorno gelatinoso nas colônias da amostra AHT. GIBBONS e colab. (1966) observaram em caldo hipersacarosado o crescimento de estreptococos cariogênicos para ratos gnotobiotos, como aderentes aos tubos de cultura e que tendiam a formar massas gelatinosas. KRASSE (1966) observou gôta de polissacarídeo no topo das colônias. CARLSSON (1965b, 1967a) observou acoplamento entre as colônias, com tendência a tornarem-se "zooglêicas", à custa de material gelatinoso. CARLSSON (1967a) comprovou as observações de KRASSE (1966). DE STOPPELAAR e colab. (1967) descreveram colônias formadoras de dextrana em placas dentais humanas.

GIBBONS & BANGHART (1967) comprovaram que a dextrana era um dos principais constituintes da matriz da placa dental. Observações interessantes foram realizadas nesse estudo:

a) constataram a aderência da dextrana à hidroxiapatita, mesmo quando recoberta por proteínas salivares, o que sugere a capacidade de ela aderir aos dentes mesmo quando banhados pela saliva na cavidade oral;

b) a dextrana forma um complexo insolúvel quando incubada com saliva, o que vem impedir que as placas dentais se desmanchem e desapareçam quando lavadas;

c) a dextrana é relativamente resistente à hidrólise - produzida pelo crescimento bacteriano, em contraste com a levana, produzida pelo Str. salivarius, grandemente susceptível a esse ataque.

Em nosso estudo, germes produtores de dextrana (Grupos I e II) manifestaram-se por colônias "zooglêicas" em ágar hipersacarosado, colônias com contorno de aspecto gelatinoso, no Grupo I; e no Grupo II, foi verificada gôta desse polissacarídeo no topo da colônia. Em caldo hipersacarosado, viscosidade e precipitação flocular foram invariavelmente verificadas nos dois Grupos, essa última principalmente com a adição de uma parte de et

nol.

Como já vimos, os estreptococos do Grupo I, semelhantes ao Str. sanguis, ocorreram com muita freqüência nos nossos raspados dentais. Convém salientar que foram verificados, em algumas ocasiões, numa mesma placa dental, dois ou três sub-Grupos desse Grupo I; nestas condições, o número total de amostras obtidas foi de 38, correspondendo a 47% do número total de amostras isoladas (38 de 81 amostras, Quadro 3).

4.3 - Inquérito sobre a causalidade, a patogenicidade e o saprofitismo com vistas às amostras de estreptococos isoladas de locais em que se produziu cárie (Quadro 6).

Causalidade. Pelo 1º postulado de Henle-Koch, o agente etiológico microbiano, sendo essencial, deve encontrar-se em todos os casos, sem exceção. É também certo, entretanto, que a recíproca não é verdadeira.

Patogenicidade. A patogenicidade de certa espécie bacteriana não se revela por um esquema simples, já que sua virulência pode apresentar diferentes graus e só se manifesta quando outros fatores, igualmente essenciais para que o caso se realize, estão presentes (susceptibilidade do hospedeiro e dieta cariogênica). Da patogenicidade da espécie decorre que sua presença deva conduzir, com certa freqüência, às alterações patológicas; conseqüentemente, essa presença é relativamente restrita, contrastando com a ubiquidade de regra do saprófita.

Saprofitismo. A presença do saprófita deve ser muito - mais freqüente na ausência, do que na presença de alteração patológica; neste último caso, entretanto, como decorrência casual de sua ubiquidade.

É no contexto dessas generalidades que procuraremos interpretar os nossos achados.

É interessante ressaltar que as amostras do Grupo I foram encontradas comumente associadas a amostras dos Grupos IV -

(Str. sp.) e V (Str. mitis, etc.) em indivíduos com índice CPO-S baixos e altos (Quadro 4), não se registrando alterações dentais após 6 meses; e também associadas a amostras do Grupo II (Str. mutans), ocasião em que algumas alterações foram observadas. Os dados obtidos indicam que os estreptococos do Grupo I não devem apresentar relações causais diretas com cárie, já que (Quadro 6, coluna 1) há cáries que se produzem na ausência deles, sem que, desse modo, possa se preencher a exigência do 1º postulado de Henle-Koch.

Os estreptococos do Grupo II (Str. mutans), ocorreram em indivíduos com CPO-S elevado e, pelos resultados observados 6 meses depois do exame bacteriológico, aparentemente, guardam - relações diretas com o problema da cárie. De fato (Quadro 6, coluna 1), todas as 4 cáries o apresentavam. Por outro lado, no mesmo Quadro, a sua indicação de patogenicidade total (cárie e descoloração do esmalte) é distintamente superior à atribuível aos demais Grupos. No Quadro 7 observamos, não o destino da placa, mas o destino do paciente que tem, ou não, o agente etiológico em alguma placa de sua boca: esse Quadro evidencia que, só quando há Str. mutans na boca (seja nesta ou naquela superfície) é que pode aparecer cárie ou descoloração do esmalte. Uma das - descolorações do esmalte, que não apresentavam Str. mutans no local 6 meses antes, poderia ter-se contaminado com Str. mutans no correr do prazo porque o paciente tinha esse estreptococo - noutra local da boca. Esses dados confirmam o preenchimento do 1º postulado de Henle-Koch (seria uma descoloração a caminho de cárie).

No paciente nº 2 (Quadro 4) tivemos o Str. mutans como o único produtor de dextrana, o que mostra que é capaz de se estabelecer a custa própria e formar placas.

No paciente nº 5 (Quadro 4) fato interessante ocorreu. Foram examinados os raspados de todos os seus quatro terceiros molares. No terceiro molar superior direito (8) foi verificada

a presença de Str. mutans, apenas; outros estreptococos foram observados no material dos outros dentes examinados; significativamente, foi o dente que apresentava o Str. mutans aquele que desenvolveu cárie.

Como se verifica no Quadro 6 (colunas 3, 4 e 5) as indicações de patogenicidade para Str. mutans são distintamente - mais elevadas do que as das outras espécies; por outro lado, é ela a espécie menos espalhada na boca (menor indicação, ou indicação negativa de saprofitismo) (Quadro 6, coluna 6). Além disso, a única alteração das 8 havidas (4 cáries e 4 descolorações) em que não se verificou previamente o Str. mutans na placa foi uma alteração do esmalte (Quadro 4, paciente nº 5), mas esse paciente estava contaminado com Str. mutans noutra placa que terminou em cárie e, é possível que tenha havido durante o prazo de 6 meses, contaminação com Str. mutans (contaminação autógena) na superfície que se apresentou com descoloração do esmalte, provavelmente a caminho de cárie. De modo que, observando, não o destino da placa isoladamente, mas o destino do paciente, verificamos que (Quadro 7), quando há Str. mutans na boca do paciente é que podem aparecer cárie ou descoloração do esmalte; o paciente que não o apresente fica destituído dessas alterações patológicas: dentre os quatro Grupos encontrados, esta correlação só se verifica com o Str. mutans.

Comprovamos fatos que vêm demonstrar como o problema da cárie é complexo. No caso do paciente nº 4 (Quadro 4), em que, curiosamente, foi registrada a maior contagem de Str. mutans de nossa investigação, ocorreu apenas descoloração de esmalte; se a descoloração é a primeira fase para o desenvolvimento da cárie (como é de regra), este fato sugere a atuação de fatores adicionais, no caso entrando, para o estabelecimento da lesão cariiosa, fatores que sabemos serem os outros do esquema de KEYES - (1962) (Fig. 1).

Nessa linha de argumentação, outro fato interessante -

Quadro 7 - Prognóstico do paciente: Alterações patológicas (4 cáries e 4 descolorações do esmalte) em 8 placas dentais de 12 pacientes nos quais se tinha verificado, 6 meses antes, a presença ou a ausência dos Grupos de estreptococos de - CARLSSON;

Verifi- cação \ Grupo	Grupo I (<u>Str.sanguis</u>)		Grupo II (<u>Str.mutans</u>)		Grupo IV (<u>Str.sp.</u>)		Grupo V (<u>Str.mitis</u> , etc.)	
Presença	P.9	C.2	P.6	C.4	P.12	C.4	P.6	C.0
		D.3		D.4		D.3		D.3
Ausência	P.3	C.2	P.6	C.0	P.0	C.0	P.6	C.4
		D.1		D.0		D.1		D.1
TOTAIS	P.12	C.4	P.12	C.4	P.12	C.4	P.12	C.4
		D.4		D.4		D.4		D.4

Legendas:

C. - Cáries (nº de ...)

D. - Descoloração (nº de ...)

P. - Pacientes (nº de ...)

foi o que aconteceu com o paciente nº 8 (Quadro 4); nele o Str. mutans foi detectado, não se registrando nem cárie nem descoloração; mas nêle é que se verificaram as menores contagens para êsse estreptococo, em nossa investigação. A presença do Str. mutans, sem causar alterações, (Quadros 4, 6 e 7) foi verificada em duas de suas nove localizações, porém, ambas as localizações em um mesmo paciente (Quadro 8). De acôrdo com o estado atual dos conhecimentos algumas hipóteses racionais podem ser feitas para explicar o fato:

a) Maior resistência do hospedeiro (que podemos tomar como resultado da ação de dois fatores em conjunto: constituição e - dieta, ou "nature and nurture"), cuja importância é tão grande que se mostra essencial;

b) O prazo de 6 meses para a instalação da lesão que consideramos como boa margem inclusiva; será êle suficiente para cada caso, em particular?

c) Menor patogenicidade da amostra (é fato comum em bacteriologia que as amostras de uma espécie possam variar em sua virulência).

d) Estaríamos diante de um portador são? Se o portador não se verifica em tantas doenças infecciosas, não poderia verificar-se também na cárie e na descoloração?

Fato assaz interessante, em que nos permitimos insistir, - (Quadro 8) é o que se verificou com relação às 12 bôcas, com presença (6 pacientes) e com ausência (6 pacientes) de Str. mutans, pois, 6 meses após, foi só nas primeiras que se encontraram alterações patológicas (cárie e/ou descoloração). Êste fato é consistente com as hipóteses:

a) de patogenicidade só de Str. mutans e saprofitismo - das demais;

b) de transmissibilidade dessa doença infecciosa dentro - de uma mesma bôca (auto-infecção): caso do paciente nº 5 (Quadro 4), considerando-se a descoloração como primeior passo à cárie, cabendo apenas notar que há descolorações de origens outras.

Quadro 8 - Exame clínico em 27 placas dentais de 12 pacientes, 6 meses após a verificação de presença, ou ausência nelas de estreptococos dos Grupos de CARLSSON.

	Grupo I (<u>Str.sanguis</u>)		Grupo II (<u>Str.mutans</u>)		Grupo IV (<u>Str.sp.</u>)		Grupo V (<u>Str.mitis</u> , etc.)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Não Ocorreu	8	30	18	67	4	15	17	62
Ocorreu								
a. Sem alterações	14 (7 pa- cientes)	52	2 (1 pa- ciente)	7	16 (8 pa- cientes)	59	7 (5 pa- cientes)	26
b. Com alterações								
Descolorações	3 2 > 5	11 7 > 18	3 4 > 7	11 15 > 26	3 4 > 7	11 15 > 26	3 0 > 3	11 0 > 11
Cárie								
TOTAIS	27	100%	27	100%	27	100%	27	100%

Enfim, todos êstes fatos apontam, de modo uniforme e sem contradições, para a responsabilidade patogênica só do Str. mutans, com exclusão das demais encontradas (Quadros 6, 7 e 8), o que não obsta a que as demais espécies, sendo acidogênicas, - quando presentes, possam agir agravando a situação (adjuvantes - ou cooperantes).

Quanto à ocorrência dos estreptococos dos sub-Grupos - do Grupo I, Ih e Ii (que guardam relações bioquímico-fisiológicas com Str. mutans, sômente variando quanto ao tipo de colônia no ágar "Mitis-salivarius", sendo similares às amostras AHT de ZINNER (1965a), isoladas de cáries incipiente do homem e cariogênicas para o "hamster") não temos dados que nos permitam conclusão, mas ocorreram em um mesmo paciente (nº 5, Quadro 4), em cárie (em que houve comprovação de Str. mutans) e em descoloração (em que não houve comprovação de Str. mutans). Supomos que as futuras investigações desta questão se encaminhem, ou para reconhecer que alguns sub-Grupos do Str. sanguis são também essencialmente patogênicos, ou que uma reclassificação bacteriológica os permitiria incluir no Grupo II (Str. mutans).

Seja como fôr, os atributos bioquímico-fisiológicos do Str. mutans continuam, dêsse modo, a reforçar o seu correlacionamento à patogenicidade.

Os estreptococos do Grupo III ocorreram apenas em um - caso que examinamos inicialmente e que foi retirado da casuística aqui apresentada por termos perdido o contato com o paciente. Acreditamos que essa ocorrência na placa tenha sido ocasional, - concordando com KRASSE (1954a e b) e com CARLSSON (1965a, 1967a) que o Str. salivarius não tenha o seu "habitat" natural nas faces dentais e sim na saliva.

Ainda como decorrência das conclusões que chegamos propomos a inclusão de um 4º fator aos 3 essenciais propostos por KEYES (1962), ou seja, a decorrência de um certo prazo de tempo entre a formação de placa e o aparecimento de cárie.

Nestas condições complementaríamos a figura proposta na página 21 da seguinte maneira:

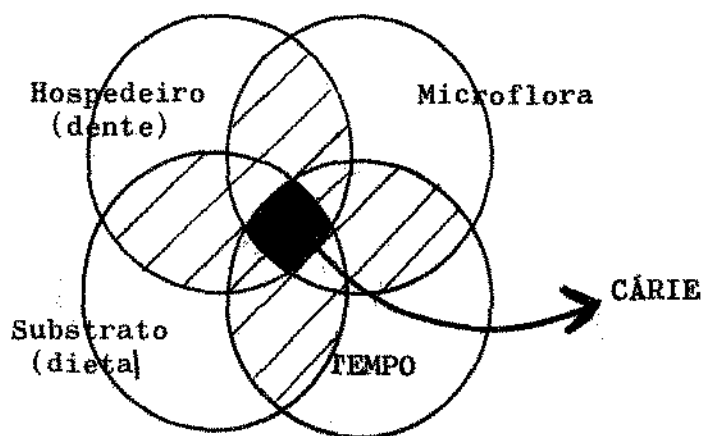


Fig. 7 - Fatores essenciais de cárie. Adaptado de KEYES (1962) com a inclusão de um 4º fator (prazo de tempo).

Por fim, cumpre reconhecer que os nossos achados, se de um lado tendem, sem nenhuma dúvida, a valorizar os exames bacteriológicos qualitativos (diagnóstico diferencial das espécies da placa dental), de outro aparentemente, estariam a indicar, nas condições de nosso trabalho, a limitada significação da aplicação da técnica da contagem de partículas viáveis, que tanto tempo consome.

4.4 - Lactobacilos e cárie dental

A contagem de lactobacilos tem sido empregada como índice de atividade cariogênica desde 1930, mas o afastamento definitivo do lactobacilo como causa de cárie vem esclarecer que a simultaneidade daqueles achados é mera coincidência; ambos êsses achados estão na dependência do mesmo regime dietético (GOLDSWORTHY, 1958; FEATHERSTONE, 1960).

4.5 - Prevenção da cárie

Ao encerrar a discussão de nossos resultados cumpre lem

brar algumas sugestões de prevenção à cárie, conseguintes com -
nossos achados:

1. Já que a dextrana não se solubiliza na água (como o faz a levana do Str. salivarius) e já que ela é formada por Str. sanguis e Str. mutans, que constituem a matriz da placa dental, -
conviria, nas fórmulas de dentifrícios ou de colutórios desviar a atenção exclusiva para nêles incorporar antissépticos, e incluir elemento que solubilizasse a dextrana (talvez algum detergente), desfazendo a matriz da placa para trazer, talvez, validade ao antigo ditado, infelizmente ilusivo: "um dente limpo (escovado) nunca se estraga (apresenta cárie)";

2. Já que a cárie é doença infecciosa em hospedeiro -
susceptível, é preciso levar em conta a sua transmissibilidade -
(copos, xícaras, talhares, beijos, doces compartilhados, etc.);

3. Seria cabível ensaiar vacinação com o agente etiológico bacteriano, caso êste ficasse rigorosamente reconhecido como tal;

4. Tôdas estas sugestões não obstaríam, evidentemente, a que fôsse prosseguidos os esforços por uma alimentação correta (inclusive em óligo-elementos, como o flúor) que promove outras vantagens, além de uma dentição melhor;

5. Já que a formação de dextrana se faz a partir de sacarose, e não de glicose, seria exequível substituir aquêlê ingrediente básico da alimentação por outro "açúcar" que, comprovadamente, não servisse de substrato à formação de dextrana (*) como a glicose?

(*) O "Pulso" (Jornal médico publicado sob a responsabilidade do Dr. R. de Souza Coelho e do Prof. Lauro Sollero), em seu número 293, de 3 de agosto de 1968, refere notícias providas de Copenhague (Dinamarca) em que se dá conta de que cientistas daquele país estão observando os resultados do consumo de açúcar fabricado por processo enzimático, com 95% de glicose e 5% de formas inferiores de açúcar, em substituição à sacarose, com a esperança de, entre outras vantagens, diminuir a prevalência da cárie dental.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

1. De todos os 26 casos em que foi conseguido, por -- meio de raspagens dentais, material a ser examinado, foram isoladas 81 amostras de estreptococos.

2. Pela ordem decrescente de ocorrência de amostras -- dos Grupos de CARLSSON (1967a), tivemos:

Grupo I	(<u>Str. sanguis</u>)		38 amostras
Grupo IV	(<u>Str. sp.</u>)		23 amostras
Grupo V	(<u>Str. mitis</u> , etc.)		11 amostras
Grupo II	(<u>Str. mutans</u>)		9 amostras
Grupo III	(<u>Str. salivarius</u>)		0 amostras

3. Os estreptococos do Grupo I (Str. sanguis), apesar de formadores de dextrana e importantes constituintes da placa dental, não se mostraram correlacionados como indutores essenciais de cárie dental.

4. O Grupo II (Str. mutans), pelos dados obtidos, de diferentes modos apresentam-se uniformes como agentes etiológicamente correlacionados à cárie.

5. Os estreptococos do Grupo III (Str. salivarius), -- parecem não ter seu "habitat" natural nas faces dentais.

6. Os estreptococos do Grupo IV (Str. sp.) e V (Str. -- mitis, etc.), pelos dados obtidos, não mostraram guardar rela--

ções diretas como indutores de cárie, o que não obsta a que possam ser adjuvantes, quando presentes, por serem acidogênicos.

7. Não foram encontrados nas placas dentais nem enterococos, nem estreptococos do Grupo lactis.

8. A identificação bacteriológica das espécies por - provas bioquímico-fisiológicas (exame qualitativo) tem significação definitiva bem maior do que as contagens de partículas - viáveis por espécie (exame qualitativo); com estas contagens - não se conseguiram grandes esclarecimentos.

9. O aspecto das colônias no ágar "Mitis-salivarius" - e a reação no caldo hipersacarosado (gelificação e precipitação pelo etanol) são duas técnicas de importância fundamental no en caminhamento do diagnóstico bacteriológico; as demais provas - bioquímico-fisiológicas têm importância secundária.

10. A redução da metodologia ao emprêgo:

a) de exames somente qualitativos (diagnóstico bacteriológico das espécies sem contagens de partículas viáveis que consomem muito tempo);

b) das duas provas fundamentais acima referidas, seguidas por outras oportunas, conforme esteja indicado, tornaria exeqüível a observação de um número maior de pacientes, com van tagem para a documentação experimental, num estudo que se apresenta como altamente promissor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, T.G. & RETTGER, L.F., 1937
Acidogenic and aciduric bacteria of the mouth and their possible relation to dental caries. J.dent.Res., 16: 489-506.
- BARBOSA, M.T. & ARAUJO, W.C., 1968
A origem do Lactobacillus da saliva. Ciência e Cultura, 20: - 443-444.
- BELDING, P.H., 1948
Carbohydrates as acid producers. Dent.Items Int., 70: 297-301.
- BELDING, P.H. & BELDING, L.J., 1948
Method of action of sucrose in causing caries acuta. Dent. - Items Int., 70: 421-425.
- BELDING, P.H. & BELDING, L.J., 1948
The oral streptococci and their differentiation. Dent.Items Int., 70: 636-640.
- BERMAN, K.S. & GIBBONS, R.J., 1966
Iodophilic polysaccharide synthesis by human and rodent oral bacteria and its relation to cariogenicity. Archs oral Biol., - 11: 533-542.
- BIBBY, B.G., 1956
Bacteriology of dental caries. Norske Tannlaegeforem.Tid., 66: 179-187.
- BIBBY, B.G. & VAN KESTEREN, M., 1939
Acid production by oral streptococci and lactobacilli. J.dent. Res., 18: 266.
- BIBBY, B.G., VOLKER, J.F. & VAN KESTEREN, M., 1942
Acid production and tooth decalcification by oral bacteria. - J.dent.Res., 21: 61-72.
- BIER, O., 1957
Bacteriologia e Imunologia. 8ª ed., São Paulo, Melhoramentos, - pgs. 757.
- BLACK, G.V., 1898
Dr. Black's conclusions reviewed again. Dent. Cosmos, 40: 440-451. In: VIEGAS, A.R., 1961.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R., 1957
Bergey's manual of determinative bacteriology. 7ª ed., Baltimore, The Williams & Wilkins Co. Reprinted, 1962, pg. 508-529.
- BURROWS, W., 1963
Textbook of Microbiology, 8ª ed., Philadelphia and London, - W.B. SAUNDERS Company, pg. 26.

- BUTTIAUX, R., BEERENS, H., & TACQUET, A., 1966
Manuel de techniques bactériologiques. 2ª ed. Editions Médicales Flammarion. Paris, pgs. 377-397.
- CAMARGO, P.S., ARAUJO, W.C., JURGENSEN, C.A. & OLIVEIRA, C.M., - 1968
 Formação de placa dental "in vitro" com estreptococos isolados de placa dental humana. Ciência e Cultura, 20: 444.
- CARLSSON, J., 1965a
 Effect of diet on presence of Streptococcus salivarius in dental plaque and saliva, Odont.Revy, 16: 336-347.
- CARLSSON, J., 1965b
 Zooglea-forming streptococci, resembling Streptococcus sanguis, isolated from dental plaque in man. Odont.Revy, 16: 348-358.
- CARLSSON, J. & EGELBERG, J., 1965.
 Effect of diet on early plaque formation in man. Odont.Revy, - 16: 112-125.
- CARLSSON, J., 1967a
 Presence of various types of non-haemolytic streptococci in - dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. - Odont.Revy, 18: 55-74.
- CARLSSON, J., 1967b
 A medium for isolation of Streptococcus mutans. Archs oral Biol, 12: 1657-1658.
- CARLSSON, J., 1968
 Plaque formation and Streptococcal colonization on teeth. Odont. Revy, 19: suppl. 14.
- CHAVES, M.M., 1960
Manual de Odontologia sanitária. 1ª parte: Teoria da odontologia sanitária. 1ª ed., 391 pp., São Paulo, s.c.p., pg. 45.
- CHAPMAN, G.H., 1946
 The isolation and testing of fecal streptococci. Am.J.digest.-Dis., 13: 105-107.
- CLARKE, J.K., 1924
 On the bacterial factor in the etiology of dental caries. Brit. J.Exptl.Path., 5: 141. Apud JAY. In: GABEL, A.B., Compêndio de Operatória Dental. 9ª ed. - Tradução - Brasil, Rio de Janeiro - Livraria Atheneu S.A., pg. 79.
- DEIBEL, R.H., 1964
 The group D streptococci. Bact.Rev., 28: 330-336.
- DE STOPPELAAR, J.D., Van HOUTE, J. & MOOR, C.E., 1967
 The presence of dextran-forming bacteria, resembling Streptococcus bovis and Streptococcus sanguis, in human dental plaque. Archs oral Biol., 12: 1199-1201.

- DUNICAN, L.K. & SEELEY, H.W., 1962
Starch hydrolysis by Streptococcus equinus. J.Bact., 83: 264-269.
- FEATHERSTONE, J.L., 1960
The oral lactobacilli of Central Australian aborigines. III.- Species isolated from nomads in Arnhem Land. Austral.Dent.J., 5: 204-209.
- FITZGERALD, R.J., 1963
Gnotobiotic contribution to oral microbiology. J.dent.Res., 42: 549-552.
- FITZGERALD, R.J. & JORDAN, H.V., 1968
Polysaccharide producing bacteria and caries. In: Art and Science of Dental Caries Research (Edited by Harris, R.S.), In press. Apud GIBBONS, R.J. & BANGHART, S., 1968.
- FITZGERALD, R.J., JORDAN, H.V. & STANLEY, H.R., 1960
Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotibiotic rat. J.dent.Res., 39: 923-935.
- FITZGERALD, R.J. & KEYES, P.H., 1960
Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J.Am.dent.Ass., 61: 9-19.
- FITZGERALD, R.J., SPINELL, D.M. & STOUT, T.H., 1968
Enzymatic removal of artificial plaques. Archs oral Biol., 13: 125-128.
- GIBBONS, R.J. & BANGHART, S., 1967
Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Archs.oral Biol., 12: 11-24.
- GIBBONS, R.J. & BANGHART, S., 1968
Induction of dental caries in gnotobiotic rats with a levan-forming streptococcus and a streptococcus isolated from sub-acute bacterial endocarditis. Archs oral Biol., 13: 297-308.
- GIBBONS, R.J., BERMAN, K.S., KNOETTNER, P. & KAPSIMALIS, B., 1966
Dental caries and alveolar bone loss in gnotibiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Archs. oral Biol., 11: 549-560.
- GIBBONS, E.J. & SOCRANSKY, S.S., 1962
Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaque; Its relation to dental caries and microbial ecology of the cavity. Arch.oral Biol., 7: 73-80.
- GOADBY, K.W., 1910
The buccal secretions and dental caries. Brit.Med.J., 2: 769-772. Apud, ORLAND, F.J. & colab., 1955. Experimental caries - in germ free rats inoculated with Enterococci. J.Am.dent.Ass., 50: 259-272.

- GOLDSWORTHY, N.E. & SPIES, H.C., 1958
The biology of the children of Hopewood House, Bowral, N.S.W., II. Observations extending over five years (1952-1956 inclusive) 3- The lactobacillus count and its relation to dental caries. Austral. Dent. J., 3: 318-330.
- GRINI, Ola, 1948
Studies on hemolytic streptococci. 1st ed., Kobenhavn, A/S Carl Fr. Mortensen, pg. 196. Apud MIRANDA, V.C., 1965.
- GUGGENHEIM, B., KÖNIG, K.G., HERZOG, E. & MUHLEMAN, H.R., 1966
The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested in rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracellular polysaccharide. Helv. Odont. Acta, 10: 101-113.
- HAMMOND, C., 1939
Artificial caries produced by streptococcus viridans. J. dent. Res., 18: 281.
- HAMMOND, C. & TUNNICLIFF, R., 1940
Artificial caries produced by Streptococcus viridans. J. dent. Res., 19: 1-10.
- HARTZELL, T.B. and HENRICI, A.T., 1917
Pathogenicity of mouth streptococci and their role in the etiology of dental disease. J. Nat. dent. Ass., 4: 477-498.
- HARRISON, R.W., 1948
Lactobacilli versus streptococci in the etiology of dental caries. J. Am. dent. Ass., 37: 391-403.
- HOWELL, A. Jr., STEPHAN, R.M. & PAUL, F., 1962
Prevalence of Actinomyces israelii, A. maeslundii, Bacterionema matruchotii, and Candida albicans in selected areas of the oral cavity and saliva. J. dent. Res., 41: 1050-1059.
- JORDAN, H.V. & KEYES, P.H., 1966
"In Vitro" methods for the study of plaque formation and carious lesion. Archs oral Biol., 11: 793-801.
- JURGENSEN, C.A. & ARAUJO, W.C., 1967
Formação de placa bacteriana "in Vitro". Arq. Cent. Est. Fac. Odont., 4: 88-93.
- KRASSE, B., 1953
The proportional distribution of different types of streptococci in saliva and plaque material. Odont. Revy, 4: 304-312.
- KRASSE, B., 1954a
The proportional distribution of Streptococcus salivarius and other streptococci in various parts of the mouth. Odont. Revy - 5: 203-211.
- KRASSE, B., 1954b
The relationship between Lactobacilli, Candida, and Streptococci and dental caries. Examination of saliva and plaque material collected on the same occasion. Odont. Revy, 5: 241-261.

- KRASSE, B., 1954c
Studies on acidogenic micro-organisms in the mouth with special reference to dental caries activity. Acta Odontol.Scand., 12: Suppl. 14.
- KRASSE, B., 1965a
The effect of the diet on the implantation of caries - inducing streptococci in hamsters. Archs oral Biol., 10: 215-221.
- KRASSE, B., 1965b
The effect of caries-inducing streptococci in hamsters fed - diets with sucrose or glucose. Archs oral Biol., 10: 223-226.
- KRASSE, B., 1966
Human streptococci and experimental caries in hamsters. Arch. oral Biol., 11: 429-436.
- KRASSE, B., EDWARDSSON, S., SVENSSON, I. & TRELL, L., 1967
Implantation of caries-inducing streptococci in the human - oral cavity. Archs oral Biol., 12: 231-236.
- KEYES, P.H., 1960
The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Arch.oral Biol., 1: 304- 320.
- KEYES, P.H., 1962
Recent advances in dental caries research. Bacteriology. - Bacteriological findings and biological implications. Internat. dent.J., 12: 443-464.
- LITTLETON, N.W., McCABE, R.M., & CARTER, C.H., 1967
Studies of oral health in persons nourished by stomach tube - II. Acidogenic properties and selected bacterial components - of plaque material. Archs oral Biol., 12: 601-609.
- LOURO FILHO, P.P., 1957
Contribuição ao estudo dos estreptococos em bolsas fisiológicas e patológicas das gengivas. TESE de Cátedra, Of.Gra. da - Livraria Globo S.A. Universidade do Rio Grande do Sul, P.A.
- LWOFF, A., VENDRELY, R., SCHAEFFER, P., RENOUX, G., LE MINOR, L. & THIBAUT, 1958.
La notion d'espèce bactérienne à la lumière des découvertes récentes. Ann.Inst.Pasteur, 94: 137-223.
- MACLEAN, J.H., 1927
Bacteriology of dental caries. Brit.Dent.Jour., 48: 579. In: GABEL, A.B., Compêndio de Operatória Dental, 9ª ed. Tradução, Rio de Janeiro. Livraria Ateneu S.A., pg. 81.
- MAHLER, I.R. & MANLY, R.S., 1956
The pH levels attained by compact layers of oral microorganisms in contact with glucose solutions. J.dent.Res., 35: 226- -232.

- McCABE, R.M., KEYES, P.H. & HOWELL, A. Jr., 1967
An "in Vitro" method for assessing the plaque-forming ability of oral bacteria. Archs oral Biol., 12: 1653-1656.
- MILLER, W.D., 1883
Agency of micro-organisms in decay of human teeth. Dental Cosmos, 25: 1. Apud HAMMOND, C. & TUNNICLIFF, R., 1940.
- MILLER, W.D., 1890
The Microorganisms of Human Mouth. Philadelphia, S.S. White - Dental Mfg. Co. In: VIEGAS, A.R., 1961.
- MIRANDA, V.C., 1965
Verificação de estreptococos em canais radiculares de dentes com reações periapicais. Tese doutoramento. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara.
- MIRICK, G.S., THOMAS, L., CURNEM, E.C. & HORSFALL, F.L., 1944.
Studies on a non hemolytic streptococcus isolated from the respiratory tract of human beings. J.Exp.Med., 80: 391-440.
- MORRIS, E.O., 1954
The bacteriology of the oral cavity. III- Streptococcus. Brit. dent.J., 96: 95-108.
- NIVEN, C.F. Jr., SMILEY, K.L. & SHERMAN, J.M., 1942
The hidrolisis of arginine by streptococci. J.Bact., 43: 651-660.
- NIVEN, C.F. Jr., SMILEY, K.L. & SHERMAN, J.M., 1946
Synthesis of a polysaccharide from sucrose by Streptococcus s.b.e., J.Bact., 51: 711-716.
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W., REYNIERS, J.A., - TREXLER, P.C., WAGNER, M., GORDON, H.A., and LUCHEY, T.D., - 1954.
Use of Germ free Animal Tecnique in the Study of Experimental Dental Carie. 1. Basic Observations on Rats Free of all Micro organisms. J.dent.Res., 33: 147-174.
- ORLAND, F.J., BLAYNEY, J.R., HARRISON, R.W., REYNIERS, J.A., - TREXLER, P.C., ERVIN, R.F., GORDON, H.A. and WAGNER, M., 1955.
Experimental caries in germ free rats inoculated with enterococci. J.Am.dent.Assoc., 50: 259-272.
- PAPAVASSILIOU, J., 1962
Species differentiation of grupo D streptococci. Appl. Microbiol., 10: 65-69. Apud MIRANDA, V.C., 1965.
- PARULA, N., BERNAN, L.E.M., CARRER, A.O. & CORRÊA, A.A., 1964
Técnica de operatória dental. 3ª ed. 613 pp. Buenos Ayres. - O.D.A. Organizacion Dental Argentina pg. 271.
- PIGMAN, W., GILMAN, E., POWELL, R. & MUNTS, L., 1957
The action of individual bacterial strains on human teeth under "in vitro" conditions. J.dent.Res., 36: 314-324.

- PIGMAN, W., HAWKINS, W., WEST, H. & GASTON, C., 1954
Carious-like lesions produced in the artificial mouth. Oral Surg., 7: 427-438.
- PINTO, P.A., 1962
Dicionário de termos médicos; Ed. Científica. Rio de Janeiro, Guanabara.
- RIGATTO, H. & SOLÉ-VERNIN, C., 1967
As alças padronizadas na avaliação quantitativa da bacteriúria. Revista Paulista de Medicina, 71: 199-210.
- SOLÉ-VERNIN, C., 1960
Contribuição para o estudo da conservação de culturas microbianas, com especial referência aos estreptococos. Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- SOLÉ-VERNIN, C. & ARAUJO, W.C., 1957
Estudos sobre os estreptococos. III- Estreptococos não hemolíticos (tipo alfa e gama) isolados de garganta de crianças normais. An. Microbiol., 5: 195-219.
- STRALFORS, A., 1950
Investigation into the bacterial chemistry of dental plaques. Odont. Tidskr., 58: 155-341.
- SWIFT, H.F., 1952
The streptococci. In: DUBOS, R.J., Bacterial and mycotic infections of man. 2ª ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Company, - pgs. 265-323. Apud MIRANDA, V.C., 1965
- SHERMAN, J.M., 1937
The streptococci. Bact. Rev., 1: 3-97.
- SHERMAN, J.M., NIVEN, C.F. & SMILEY, K.L., 1943
Streptococcus salivarius and other non hemolytic streptococci of human throat. J.Bact., 45: 249-263.
- SHIERE, F.R., GEORGI, C.E. & IRELAND, R.L., 1951
A study of Streptococcus salivarius and its relationship to dental caries process. J.dent.Res., 30: 116-125.
- SIMS, W., 1965
Measurement of the rates of acid production of surface aggregates of Lactobacilli, Streptococci and some other oral micro-organisms. Brit.dent.J., 119: 22-28,
- TANZER, J.M. & McCABE, R.M., 1968
Selection of plaque-forming streptococci by the serial passage of wires through sucrose-containing broth. Archs oral Biol., - 13: 139-143.
- TEFFT, H.I., 1942
Possible significance of streptococci in the production of dental caries. J.dent.Res., 21: 318.
- TEFFT, H.I. & BIBBY, B.G., 1940
Streptococci isolated from the mouth. J.dent.Res. 19: 285-286.

THE DIVISION OF LABORATORIES AND DIVISION OF DENTAL HEALTH. THE
TENNESSEE DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH, 1961
Desing and procedures for Tennessee study of bacteriologic -
tests of caries activity. Nashville, Tennessee.

VIEGAS, A.R., 1961

Odontologia sanitária. Aspectos preventivos da cárie dentária.
1ª ed. Sao Paulo, s.c.p., pgs. 8; 92-96; 104-114.

WAHL, R. & MEYER, P., 1956a

Les épreuves dites "Biochimiques" (Addtions enzymatiques et re
sistance a des agents inhibiteurs) Pour l'identification des
streptocoques. II- Resultats. Ann.Inst. Pasteur, 91: 147-161.

WAHL, R. & MEYER, P., 1956b

Les épreuves dites "Biochimiques" (Actions inzimatiques et re
sistance a des agents inhibiteurs) Pour l'identification des
streptocoques. III- Interpretation. Ann.Inst.Pasteur, 91: -
279-291.

WILLIAMS, J.L., 1897

A contribution to Study of Pathology of Enamel. Dent. Cosmos,
39: 169-269, 257. In: VIEGAS, A.R., 1961.

WILLIAMS, R.E.O., 1958

Laboratory diagnosis of streptococos infections. Bull.Wld. -
Hlth.Org., 19: 153-176. Apud MIRANDA, V.C., 1965.

WILLIAMS, R.E.O. & HIRCH, A., 1950

The detection of streptococci in air. J. Hyg., 48: 504-524.

WILLIAMS, N.B., FORBES, M.A., BLAU, E. & EICKENBERG, C.F., 1950

A study of simultaneous occurrence of enterococci, Lactobacil-
li, and yeasts in saliva from human beings., J.dent.Res., 29:
563-570.

WILSON, G.S. & MILES, A.A., 1955

Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Imunity. -
4ª ed., vol. II. London, Edward Arnold LTD, I vol. 649-698.

WILSON, G.S. & MILES, A.A., 1964

Principles of bacteriology and Imunity. 5ª ed., II vol. Lon--
don, Edward Arnold (Publishers) LTD, vol. I pgs. 693-745.

WINKLER, K.C. & BACKER-DIRKS, O., 1958

The mechanism of the dental plaque. Internat. Dent. J., 8:561-
585.

WOOD, J.M. & CRITCHLEY, P., 1966

The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a -
cariogenic streptococcus. Archs oral Biol., 11: 1039-1042.

YARDENI, J., SULITZEANU, D. & CITRI, N., 1959

Streptococci in dental caries. J.dent.Res., 38: 164-171.

- ZINNER, D.D., ARAN, A.P., JABLON, J.M., BRUST, B. & SASLAW, M.S., 1964.
Experimental caries induced by human Streptococci. J.dent.Res., 43: 859-860.
- ZINNER, D.D., JABLON, J.M., ARAN, A.P. & SASLAW, M.S., 1965a
Experimental caries induced in animals by streptococci of human origin. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 118: 766-770.
- ZINNER, D.D., ARAN, A.P., JABLON, J.M. & SASLOW, M.S., 1965b
Cariogenic streptococci related to types of clinical caries. - International Association for Dental Research. General Meeting. Abstracts, p. 102.
- ZINNER, D.D. & JABLON, J.M., 1968
Human streptococcal strains in experimental caries. In: Art and Science of Dental Caries Research (Edited by HARRIS, R.S.) - In press, Apud GIBBONS & BANGHART, 1968.
- ZINSSER, H. & BAYNE-JONES, S., 1947
Tratado de bacteriologia. 1ª ed., Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, pg. 304, 305, 310.

A P Ê N D I C E

FICHAS DA CASUÍSTICA

Paciente: M.A.R. Idade: 19 anos Naturalidade: São Paulo-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com freqüência

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia

CPO-S: C 0 ; O 6 ; E 0 ; Ei 0 CPO-S 6 ; DP 30

Amostras	18 a	18 b	18 a	18 b						
	1	1	1	1						
Provas										
Tipo de col.	L.	R.	L.	R.						
Bile-solubilidade	-	-	-	-						
Hemólise	°	°	°	°						
Catalase	-	-	-	-						
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	-	+						
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)	-	-	-	-						
a. Uma parte	-	+	-	+						
b. Três partes	-	-	-	-						
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-						
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-						
Cresc.em 0,0% Az.Met.	-	-	-	-						
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-						
Hidrólise de Arginina	-	+	-	+						
Hidrólise do Amido	°	+	°	+						
Fermentação										
a. Inulina	-	-	-	-						
b. Rafinose	-	+	-	+						
c. Manitol	-	-	-	-						
d. Sorbitol	-	-	-	-						
Classificação em	Grupo IV	Grupo Ig	Grupo IV	Grupo Ig						
Grupos e sub-Grupos										

Paciente*: J.R.C. Idade: 20 anos Naturalidade: São Paulo-SP
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com freqüência
 Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia
 CPO-S: C 1 ; O 28 ; E 0 ; Ei 0 ; CPO-S 29 ; DP 30

Amostras	a	b	a	b						
	 a	 b	 a	 b						
Provas										
Tipo de col.	L.	R.	L.	R.						
Bile-solubilidade	-	-	-	-						
Hemólise	.	.	.	.						
Catalase	-	-	-	-						
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	-	+						
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	-	+						
b. Três partes	-	-	-	-						
Cresc.em 4% de NaCl	-	+	-	+						
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-						
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-						
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-						
Hidrólise de Arginina	-	-	-	-						
Hidrólise do Amido	.	-	.	-						
Fermentação										
a. Inulina	-	+	-	+						
b. Rafinose	-	+	-	+						
c. Manitol	-	+	-	+						
d. Sorbitol	-	+	-	+						
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo II	Grupo IV	Grupo II						

Paciente: R.G. Idade: 18 anos Naturalidade: Piracicaba-SP
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Raramente ingere-os
 Hábitos: fumante Escovação dental: ocasionalmente
 CP0-S: C 0 ; O 3 ; E 0 ; Ei 0 CP0-S 3 ; DP 30

Amostras	<u>3</u> <u>a</u>	<u>3</u> <u>b</u>	<u>3</u> <u>c</u>	<u>3</u> <u>a</u>	<u>3</u> <u>b</u>					
Provas										
Tipo de col.	L.	R.	R.	L.	R.					
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-					
Hemólise	°	°	alfa	°	°					
Catalase	-	-	-	-	-					
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	-	+	-	-					
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	-	+	-	-					
b. Três partes	-	-	+	-	-					
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-					
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-					
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	+	-	-					
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-					
Hidrólise de Arginina	+	-	+	-	+					
Hidrólise do Amido	°	°	+	°	°					
Fermentação										
a. Inulina	-	-	+	-	-					
b. Rafinose	-	+	-	-	+					
c. Manitol	-	-	-	-	-					
d. Sorbitol	-	-	-	-	-					
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo Ve	Grupo Vc	Grupo If	Grupo IV	Grupo Vf					

Paciente: R.L.S.V. Idade: 20 anos Naturalidade: São Paulo-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com frequência

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia

CPO-S: C 0 ; O 35 ; E 1 ; Ei 0 ; CPO-S 40 ; DP 31

Amostras	4 8 a	4 8 b	4 8 c	4 8 d	4 8 a	4 8 b	4 8 c	4 8 d	4 8 e	
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	R.	R.	L.	L.	R.	R.	R.	
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hemólise	°	°	alfa +H	°	°	°	°	°	°	
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	-	+	+	-	-	+	+	+	
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	-	+	+	-	-	+	+	+	
b. Três partes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hidrólise de Arginina	+	-	+	-	+	-	+	-	-	
Hidrólise do Amido	°	°	+	-	°	°	+	+	-	
Fermentação										
a. Inulina	-	-	+	+	-	+	-	+	+	
b. Rafinose	-	+	-	+	-	+	+	+	+	
c. Manitol	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
d. Sorbitol	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo Vc	Grupo If	Grupo II	Grupo IV	Grupo Vc	Grupo Ig	Grupo Ib	Grupo II	

Paciente: S.S. Idade: 22 anos Naturalidade: Penápolis-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com frequência

Hábitos: (fumante) Escovação dental: 4 vezes ao dia

CPO-S: C 0 ; O 20 ; E 3 ; Ei 0 ; CPO-S 35 ; DP 29

Amostras	a	b	c	d	a	b	c			
	5	5	5	5	5	5	5			
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	L.	R.	L.	L.	R.			
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-	-			
Hemólise	alfa	alfa	alfa	.	.	.	alfa			
Catalase	-	-	-	-	-	-	-			
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	+	+	-	+	+			
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	+	+	-	+	+			
b. Três partes	-	-	+	-	-	+	+			
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	+	+	-	-	-			
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-			
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-			
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-			
Hidrólise de Arginina	-	+	-	-	-	-	-			
Hidrólise do Amido	.	+	+	-	.	-	-			
Fermentação										
a. Inulina	-	-	+	+	-	+	+			
b. Rafinose	-	+	+	+	-	+	+			
c. Manitol	-	-	-	+	-	-	+			
d. Sorbitol	-	-	+	+	-	+	+			
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo Ig	Grupo Ih	Grupo II	Grupo IV	Grupo Ih	Grupo Ii			

Continuação

Paciente: S.S. Idade: 22 anos Naturalidade: Penápolis-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com freqüência

Hábitos: (fumante) Escovação dental: 4 vezes ao dia

CP0-S: C 0 ; O 20 ; E 3 ; Ei 0 ; CP0-S 35 ; DP 29

Amostras	58 a	58 b	58 c	58 d	58 a	58 b				
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	L.	R.	L.	R.				
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-				
Hemólise	•	•	•	•	•	•				
Catalase	-	-	-	-	-	-				
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	+	+	+	+				
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	+	+	+	+				
b. Três partes	-	-	+	+	+	+				
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	+	-	-				
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-				
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-				
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-				
Hidrólise de Arginina	-	+	-	-	-	-				
Hidrólise do Amido	•	+	+	+	+	+				
Fermentação										
a. Inulina	-	-	+	+	+	+				
b. Rafinose	-	+	+	+	+	+				
c. Manitol	-	-	-	+	-	+				
d. Sorbitol	-	-	+	+	+	+				
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo Ig	Grupo Ih	Grupo Ii	Grupo Ih	Grupo Ii				

Paciente: C.M.C. Idade: 22 anos Naturalidade: São Paulo-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os ocasionalmente

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes por dia

CPO-S: C 0; O 9; E 0; Ei 0; CPO-S 9; DP 32

Amostras	6	6							
Provas									
Tipo de col.	L.	L.							
Bile-solubilidade	-	-							
Hemólise	.	.							
Catalase	-	-							
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	-							
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)									
a. Uma parte	-	-							
b. Três partes	-	-							
Cresc.em 4% de NaCl	-	-							
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-							
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-							
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-							
Hidrólise de Arginina	-	-							
Hidrólise do Amido	.	.							
Fermentação									
a. Inulina	-	-							
b. Rafinose	-	-							
c. Manitol	-	-							
d. Sorbitol	-	-							
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo IV							

Paciente : A.M. Idade: 20 anos Naturalidade: Sorocaba-SP
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com frequência
 Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia
 CPO-S: C 0 ; O 31 ; E 1 ; Ei 0 ; CPO-S 36 ; DP 29

Amostras	a	b	c	d	e	a	b	c	d	
	78	78	78	78	78	78	78	78	78	
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	R.	R.	R.	L.	L.	R.	L.	
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hemólise	alfa	o	o	alfa	alfa	o	o	o	o	
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	-	+	+	+	-	+	+	
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	-	+	+	+	-	+	+	
b. Três partes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hidrólise de Arginina	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
Hidrólise do Amido	o	+	o	+	+	+	o	+	+	
Fermentação										
a. Inulina	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
b. Rafinose	-	+	+	-	+	+	-	-	+	
c. Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
d. Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Classificação em	Grupo IV	Grupo Ib	Grupo Vf	Grupo Ia	Grupo Id	Grupo Ib	Grupo IV	Grupo Ia	Grupo Id	
Grupos e sub-Grupos										

Paciente: J.F. Idade: 20 anos Naturalidade: São Caetano-sp
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Ocasionalmente
 Hábitos: (fumante) Escovação dental: 4 vezes ao dia
 CPO-S: C 0 ; O 16 ; E 2 ; Ei 0 ; CPO-S 26 ; DP 28

Amostras	<u>8</u> a	<u>8</u> b	<u>8</u> c	<u>8</u> d	<u>8</u> a	<u>8</u> b	<u>8</u> c	<u>8</u> d	<u>8</u> e
Provas									
Tipo de col.	L.	L.	R.	R.	L.	L.	R.	R.	R.
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólise	alfa	.	alfa	.	.	alfa	.	.	.
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)									
a. Uma parte	+	-	+	-	-	+	-	-	-
b. Três partes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise de Arginina	+	-	+	-	+	+	-	+	-
Hidrólise do Amido	+	.	+	-	+	+	.	+	-
Fermentação									
a. Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b. Rafinose	+	-	-	-	+	-	-	+	-
c. Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d. Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo Ig	Grupo IV	Grupo Ia	Não mais isoladas nas subculturas a partir do sangue (características do Grupo II)	Grupo IV	Grupo Ig	Não mais isolada nas subculturas a partir do sangue (características do Grupo I)	Grupo Vc	Não mais isolada nas subculturas a partir do sangue (características do Grupo II)

Pacientes: K.K. Idade: 19 anos Naturalidade: Zahle - Líbano
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Consumo moderado
 Hábitos: (não possui) Escovação dental: 3 vezes ao dia
 CPO-S: C 0 ; O 16 ; E 1 ; Ei 0 ; CPO-S 21 ; DP 31

Amostras	a	b	c	d	a	b	c	d		
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	R.	R.	L.	L.	R.	R.		
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hemólise	.	.	alfa	.	.	alfa	alfa	alfa		
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-		
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	+	+	-	+	+	+		
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma Parte	-	+	+	+	-	+	+	+		
b. Três Partes	-	-	-	-	-	+	-	-		
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-		
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-		
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-		
Cresc. em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-	-	-		
Hidrólise de Arginina	-	-	+	+	-	-	-	-		
Hidrólise do Amido	.	+	+	+	.	+	+	+		
Fermentação										
a. Inulina	-	-	+	-	-	+	+	+		
b. Rafinose	-	-	-	+	-	-	+	+		
c. Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-		
d. Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	+		
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo Ia	Grupo If	Grupo Ig	Grupo IV	Grupo If	Grupo Ib	Grupo Ih		

Continuação

Paciente: K.K. Idade: 19 anos Naturalidade: Zahle-Líbano

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Consumo moderado

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 3 vezes ao dia

CPO-S: C 0 ; O 16 ; E 1 ; Ei 0 ; CPO-S 21 ; DP 31

Amostras	a	b	c	d						
	98	98	98	98						
Provas										
Tipo de col.	L.	L.	R.	R.						
Bile-solubilidade	-	-	-	-						
Hemólise	.	gama	alpha	alpha						
Catalase	-	-	-	-						
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	+	+						
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	+	+						
b. Três partes	-	-	-	-						
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-						
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-						
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-						
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-						
Hidrólise de Arginina	+	-	-	+						
Hidrólise do Amido	.	+	+	+						
Fermentação										
a. Inulina	-	-	-	-						
b. Rafinose	-	-	+	+						
c. Manitol	-	-	-	-						
d. Sorbitol	-	-	-	-						
Classificação em										
Grupos e sub-Grupos	Grupo IV	Grupo Ia	Grupo Ib	Grupo Ig						

Paciente: M.T.B.C. Idade: 20 anos Naturalidade: Amparo-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Ingere-os com frequência

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia

CPO-S: C 3 ; O 28 ; E 0 ; Ei 0 ; CPO-S 28 ; DP 31

Amostras	10 g a	10 g b	10 g a	10 g b	10 g c					
Provas										
Tipo de col.	L.	R.	L.	L.	R.					
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-					
Hemólise	.	alfa	.	.	.					
Catalase	-	-	-	-	-					
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	-	+	-					
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	-	+	-					
b. Três partes	-	-	-	-	-					
Cresc.em 4% de NaCl	-	+	-	-	-					
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-					
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-					
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-					
Hidrólise de Arginina	-	-	+	-	-					
Hidrólise do Amido	.	-	.	-	.					
Fermentação										
a. Inulina	+	+	-	+	+					
b. Rafinose	-	+	-	+	-					
c. Manitol	-	+	-	-	-					
d. Sorbitol	-	+	-	+	-					
Classificação em										
Grupos e sub-Grupos	Grupo Vb	Grupo II	Grupo IV	Grupo Ih	Grupo Vb					

Paciente: F.A. Idade: 21 anos Naturalidade: Franca-SP
 Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal
 Ingestão de alimentos açucarados: Consumo moderado
 Hábitos: (não possui) Escovação dental: 4 vezes ao dia
 CPD-S: C: 0 ; O 33 ; E 1 ; Ei 0 ; CPD-S 38 ; DP 30

Amostras	11 8 a	11 8 b	11 8 c	11 8 a	11 8 b	11 8 c				
Provas										
Tipo de col.	R.	L.	L.	R.	L.	L.				
Bile-solubilidade	-	-	-	-	-	-				
Hemólise	gamma	.	.	.	.	alfa				
Catalase	-	-	-	-	-	-				
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose	-	+	-	-	+	-				
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)										
a. Uma parte	-	+	-	-	+	-				
b. Três partes	-	++	-	-	++	-				
Cresc.em 4% de NaCl	-	-	-	-	-	+				
Cresc.em 6,5% de NaCl	-	-	-	-	-	-				
Cresc.em 0,01% Az.Met.	-	-	-	-	-	-				
Cresc.em 0,1% Az.Met.	-	-	-	-	-	-				
Hidrólise de Arginina	-	+	+	+	+	-				
Hidrólise do Amido	.	+	.	.	+	.				
Fermentação										
a. Inulina	-	+	-	-	+	-				
b. Rafinose	-	-	-	-	-	-				
c. Manitol	-	-	-	-	-	-				
d. Sorbitol	-	-	-	-	-	-				
Classificação em Grupos e sub-Grupos	Grupo Va	Grupo If	Grupo IV	Grupo Ve	Grupo If	Grupo IV				

Paciente: J.C.V. Idade: 21 anos Naturalidade: Indiana-SP

Profissão: Estudante Saúde Oral: Normal

Ingestão de alimentos açucarados: Baixo consumo

Hábitos: (não possui) Escovação dental: 3 vezes ao dia

CPO-S: C 1 ; O 20 ; E 1 ; Ei 0 ; CPO-S 26 ; DP 29

Amostras	12 8 -	12 8 a	12 8 b	12 8 c					
Provas									
Tipo de col.		L.	R.	L.					
Bile-solubilidade		+		+					
Hemólise		alfa		alfa					
Catalase		-		-					
Viscosidade em caldo com 5% de sacarose		+		+					
Pp.densa após adição de etanol (99,5%)									
a. Uma parte		-		+					
b. Três partes		-		-					
Cresc. em 4% de NaCl		-		-					
Cresc. em 6,5% de NaCl		-		-					
Cresc. em 0,01% Az. Met.		-		-					
Cresc. em 0,1% Az. Met.		-		-					
Hidrólise de Arginina		+		+					
Hidrólise do Amido		+		+					
Fermentação									
a. Inulina		-		+					
b. Rafinose		-		-					
c. Manitol		-		-					
d. Sorbitol		-		-					
Classificação em Grupos e sub-Grupos		Grupo IV		Grupo If					