

JOSÉ FRANCISCO HÖFLING

**Serologia Aplicada ao Estudo de Microrganismos
de Placa Dentária e seu Significado
em Relação a Cárie**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para o Curso de Habilitação a Docência Livre na Área de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral.

PIRACICABA, SP

1981

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

À memória do amigo, VARDECI GAMA;

À Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Rio Claro.

A G R A D E C I M E N T O S

Nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram na elaboração deste trabalho.

A Direção desta Casa de Ensino, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. ANTONIO CARLOS NEDER e seu associado, Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI;

Ao Prof. Dr. JAN CARLSSON, Professor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Umea, Departamento de Microbiologia Oral, pelo fornecimento do material;

A Profa. LEDA RODRIGUES DE ASSIS, companheira de trabalho, cuja inestimável colaboração contribuiu efetivamente para a realização desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. DARCY MARTINS DA SILVA, Professor da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelo espírito de amizade, estímulo e apoio;

A Dra. CARMINDA DA CRUZ LANDIM, Professora do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências - UNESP, Campus de Rio Claro, com a qual tivemos a oportunidade de iniciar nossas atividades científicas e cujos ensinamentos, estímulo e orientação segura, foram fundamentais para formação de nossa carreira universitária;

Ao Prof. Dr. AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA, Professor da

disciplina de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, que no transcorrer de minha atividade universitária me proporcionou, além de toda orientação científica e profissional, uma amizade sincera, apoio e segurança individual;

Em particular a minha esposa, ELOISA DE MATTOS HÖFLING, Faculdade de Educação da UNICAMP;

Demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em particular a Srta. MARIA APARECIDA NALIN, pela qualidade da datilografia e Srta. MARIA DE FÁTIMA F. S. DANTAS, pelos desenhos e esquemas.

SUMÁRIO

	pg.
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	4
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	104
CONCLUSÕES	116
RESUMO	120
SUMMARY	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO		Pg.
1	- Relação das espécies de estreptococos utilizadas nos experimentos	46
2	- Esquema de imunização dos antissoros obtidos pela injeção no linfonódu <u>l</u> o, veia marginal e intramuscular de coelho, com suspensões bacterianas de <i>S. sanguis</i>	52
3	- Título máximo dos antissoros obtidos nas imunizações	61
4	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas	72
5	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas	73
6	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas	74
7	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167-168. Testes serológicos de dupla difusão em gel	

	de ágar-água a 1% com antígenos de suspen	
	sões bacterianas	75
8	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167-168. Tes	
	tes serológicos de dupla difusão em gel	
	de ágar a 1% em tampão veronal com antíge	
	nos de suspensões bacterianas	76
9	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167-168. Tes	
	tes serológicos de dupla difusão em gel	
	de ágar a 1% em tampão de PBS com antíge-	
	nos de suspensões bacterianas	77
10	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes	
	serológicos de dupla difusão em gel de á-	
	gar a 1% em tampão veronal, com antígenos	
	de suspensões bacterianas, em água desti-	
	lada estéril	78
11	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes	
	serológicos de dupla difusão em gel de á-	
	gar a 1% em tampão veronal, com antígenos	
	de suspensões bacterianas, em água desti-	
	lada estéril	79
12	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes	
	serológicos de dupla difusão em gel de á	
	gar a 1% em tampão veronal com antígenos'	
	de suspensões bacterianas, em salina esté	
	ril	80
13	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 162. Testes	
	serológicos de dupla difusão em gel de á-	

	gar a 1% em tampão veronal, com antígenos de suspensões bacterianas, em salina estéril	81
14	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas solúveis em água destilada estéril	82
15	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, em água destilada estéril.....	83
16	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.....	84
17	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	85
18	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão de PBS, com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	86
19	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 167. Testes	

	serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS, com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	87
20	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	88
21	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	21
22	- <i>S. sanguis</i> contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	90
23	- Antissoro AS.Ss.ATCC 168 contra <i>S. sanguis</i> Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall	91
24	- Antissoro AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril	92

- 25 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril 93
- 26 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em salina estéril. 94
- 27 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall (R-R) 95
- 28 - Antissoro AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall (R-R) 96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG.		Pg.
1	- Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril.(AS): AS.Ss.ATCC 162. Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> , (2) <i>S. mitis</i> , (3) <i>S. faecalis</i> , (4) <i>S. salivarius</i> , (5) <i>S. mutans</i>	97
2	- Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em salina 0,85%. (AS): AS.Ss. - ATCC 162. Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> , (3) <i>S. mitis</i> , (3) <i>S. faecalis</i> , (4) <i>S. salivarius</i> , (5) <i>S. mutans</i>	98
3	- Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> , (2) <i>S. mitis</i> , (4) <i>S. salivarius</i> , (5) <i>S. mutans</i>	99
4	- Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS):AS.Ss. ATCC 167. Antígenos: (1) <i>S. sanguis</i> , (2) <i>S. mitis</i> (3) <i>S. faecalis</i> , (4) <i>S. salivarius</i>	100
5	- Reação de dupla difusão em gel de ágar-água	

- a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS): AS. Ss. ATCC 168. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis* 101
- 6 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1%, com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS):AS.Ss.ATCC 167. Antígeno: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius* 102
- 7 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS):AS.Ss.ATCC 168. Antígeno: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius* 103

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA	Pg.
1 - Preparo de antígenos bacterianos para imunização	48
2 - Preparo de antígenos bacterianos	50
3 - Sequências utilizadas para o preparo de extratos de suspensões bacterianas para serem utilizados nas reações serológicas.....	54
4 - Preparo de extratos bacterianos para serem utilizados nas reações serológicas, segundo Lancefield	56
5 - Preparo de extratos bacterianos para serem usados nas reações serológicas, segundo Rantz & Randall	57
6 - Fotografia e gráfico dos tipos de linha de precipitação (LP) observadas nas reações serológicas de dupla difusão em ágar, entre antissoros e antígenos de suspensões bacterianas (homólogos e heterólogos)	63

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A cárie dentária está entre as mais importantes doenças da população brasileira. É uma doença localizada, progressiva, que se inicia pela desmineralização da superfície externa do dente, devida a ácidos orgânicos produzidos localmente por bactérias que fermentam depósitos de carboidratos da dieta. Dessa forma, a cárie resulta de uma complexa interação entre hospedeiro, dieta e microrganismo.

Uma série de experimentos preliminares levados a efeito por KEYES (1960), o qual estabeleceu que a cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível, abriram muitas perspectivas em pesquisas sobre o assunto. Experimentos posteriores levados a efeito por FITZGERALD e KEYES (1960), demonstraram que certos estreptococos isolados de placas dentárias, podem induzir cárie em animais de laboratório. Essas observações deram origem a extensivos estudos com "estreptococos indutores de cárie". Nos últimos anos as pesquisas tem demonstrado a presença de estreptococos específicos como fatores bacterianos na complexa etiologia da cárie dentária.

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

A determinação dos principais componentes como fatores bacterianos na complexa etiologia da cárie dentária é assunto fascinante e de interesse teórico e prático. Nos últimos anos tem-se observado a publicação de resultados de pesquisas que ampliaram o conhecimento sobre a classificação, ecologia e significado biológico de estreptococos de placa dentária. Para se determinar a presença desses componentes associados ao desenvolvimento da cárie dentária, particularmente a classificação, identificação e caracterização desses microrganismos, métodos serológicos tem sido de grande valia (BRATHALL, 1970, 1972; COYKENDALL, 1974; DODD, 1949).

Neste trabalho nós procuramos analisar algumas espécies de estreptococos de placa dentária do ponto de vista serológico com o objetivo de contribuir nos estudos de identificação, caracterização e classificação de microrganismos orais, particularmente associados ao mecanismo de cárie dentária.

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

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

A flora microbiana da boca se apresenta extremamente complexa e variada na sua composição, dependendo de sua localização (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971; HARDIE & BOWDEN, 1974a). Os estreptococos compreendem proporções significantes da microflora apresentando 45% do total da superfície dorsal da língua, 46% da saliva, 28% da placa dentária e 29% da fenda gengival (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971). Eles estão entre os primeiros colonizadores da cavidade oral após o nascimento, porém, algumas espécies como *S. sanguis* e *S. mutans* somente fazem parte dessa flora após a erupção dos primeiros dentes decíduos (MCCARTHY et al, 1965; CARLSSON et al, 1970a, b, 1975).

A composição microbiana da placa dentária tem sido amplamente estudada por ser considerada o principal fator etiológico nas duas maiores doenças, a cárie dentária e a doença periodontal (HARDIE & BOWDEN, 1975; THEILADE & THEILADE, 1976). Os estreptococos tem chamado a atenção dos pesquisadores como um patógeno específico na cárie dentária. Os *estreptococos mutans* mostram-se indutores de cárie em ani-

mais e há também bastante evidências dessa espécie estar associada a cárie dentária em humanos, o que se pode observar na exaustiva literatura a respeito. Outras espécies de estreptococos presentes na boca tem recebido menor atenção nos recentes anos, embora, muitas dessas espécies tem sido vistas presentes em sérias infecções sistêmicas como a endocardite.

A maioria dos estreptococos isolados da boca pertencem aos tipos viridescentes (viridans) e não-hemolíticos (indiferente) baseados na placa de agar-sangue e podem ser considerados como encontrados entre o grupo "viridans" (SHERMAN, 1937). Segundo COLMAN (1976), entretanto, o fenômeno de hemólise parece não ser uma propriedade particular desses microrganismos que possa ser utilizada com segurança, já que todos os tipos de hemólise (α , β e γ) ocorre em isolados orais.

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

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

na Tabela 1 dizem respeito a maioria dos estreptococos isolados da cavidade oral, embora outros "strains" são encontrados os quais não se enquadram entre as taxas existentes.

Alguns dos estreptococos orais, especialmente certos "strains" de *S. mutans* requerem dióxido de carbono para o crescimento em meio sólido. Relativamente poucas informações são disponíveis acerca da prevalência, distribuição e propriedades de espécies anaeróbicas na cavidade oral. Cocos Gram positivos anaeróbicos tem sido mencionados em estudos de cultura de placa dentária (SOCRANSKY et al, 1977) e também tem sido isolado de lesões cariosas profundas da dentina (EDWARDSSON, 1974), infectando a câmara pulpal e as raízes do canal (BERG & NORD, 1973; KANTZ & HENRY, 1974; WITTGOW & SABISTON, 1975; SUNDQUIST, 1976) e abscessos dentários (SABISTON & GOLD, 1974). Parece necessário que técnicas de isolamento de anaeróbios mais elaborados são indispensáveis para o reconhecimento de estreptococos anaeróbicos de material oral. Estudos realizados por HARDIE & MARSH (1978) em placa supragengival, utilizando-se o sistema anaeróbico convencional (Jarra anaeróbica) demonstraram grande dificuldade no isolamento de estreptococos anaeróbicos. Isso sugere a necessidade de maiores estudos nessa área.

T A B E L A 1

NOMENCLARURA DOS ESTREPTOCOCOS COMUNENTE ENCONTRADOS
NA BÔCA.

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

Dx + mitior, *S. mitior* dextrana positivo

Streptococcus mutans

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

Vários serotipos de *S. mutans* já foram descritos (BRATTHAL, 1970; PERCH et al, 1974) os quais tem sido correlacionados com a composição de carboidratos da parede celular (HARDIE & BOWDEN, 1974b). Estudos levados a efeito com o conteúdo básico do DNA e híbridos de DNA entre as diversas cepas de *S. mutans* associados com dados bioquímicos e serológicos, sugeriram a proposição de sub espécies (COYKENDALL, 1974). Mais recentemente COYKENDALL (1977) sugeriu que as sub espécies propostas fossem consideradas espécies, denominadas *S. mutans*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. Não está claro, até o momento, como estas espécies poderão ter um sentido prático. Parece ter mais sentido se todos os laboratórios e livros de referência reconhecessem as diversas cepas de *S. mutans* (coletivamente) antes de introduzir cinco diferentes nomes para as diversas variedades genéticas. Algumas características bioquímicas se correlacionam muito bem com as diferentes sub divisões de *S. mutans*, tal como a produção de amônia da arginina pelo sero

tipo b (*S. rattus*) e tais observações levaram ao desenvolvimento de um esquema bioquímico para o reconhecimento dos diferentes serotipos (SHKLAIR & KEENE, 1974). Esse esquema foi originalmente formulado com base nas reações de um pequeno número de variedades de referência, o que torna-se difícil ampliar tais fatos para as demais cepas de estreptococos.

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

Streptococcus sanguis

Essa espécie foi originalmente isolada do sangue de pacientes com endocardite bacteriana mas atualmente é reconhecida como uma das espécies mais numerosas da cavidade oral (CARLSSON, 1965, 1967). Observações anteriores da literatura demonstrando uma relação do *S. sanguis* com o grupo H de Lancefield têm sido discutidos por vários autores (COLMAN & WILLIAMS, 1972; COLMAN, 1976; HARDIE & BOWDEN, 1976a).

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

desse microrganismo quando ele esta presente em casos de endocardite. Cepas de *S. sanguis* também já foram isolados de solo (GLEDHILL & CASIDA, 1969).

Variedades de *S. sanguis* hidrolizam arginina e esculina, produzem H₂ e formam glucano extracelular (dextrana) quando crescem em presença de sacarose.

Estudos serológicos dessa espécie, indicaram que há serotipos diferentes designados I, II e I/II (WASHBURN et al., 1946) representado pelas variedades NCTC 7863 (ATCC 19556), NCTC 7864 (ATCC 10557) e NCTC 7865 (ATCC 10558). Variedades lembrando a NCTC 7864 (tipo II) formam grupos separados do tipo I nos estudos taxonômicos feitos por COLMAN (1968) e CARLSSON (1968), e essa evidência, associada com a parede celular e diferenças serológicas e genéticas, fornecem um forte argumento para a separação dessa espécie (*S. mitior*). Nos recentes relatos de PARKER & BALL (1976) os nomes de *S. sanguis* e *S. mitior* são usados para descrever esses dois grupos de organismos, enquanto FACKLAM (1977) e os laboratórios de referências, preferem manter os termos *S. sanguis*, biotipos I e II. Muitos autores, encontraram ocasionalmente variedades "intermediárias" que não se posicionam claramente dentro dessas duas espécies ou biotipos. Estudos levados a efeito por PARKER & BALL (1976), demonstraram que 37% das cepas de *S. sanguis* reagem com o antissoro do grupo H de Lancefield.

Streptococcus mitior

O nome *S. mitior* originou-se de SCHOTTMULLER (1903) e como mencionado anteriormente, proposto por COLMAN & WILLIAMS (1972) para o grupo de cepas as quais formam um aglomerado homogêneo em estudos taxonômicos numericos de

COLMAN (1968). Essas cepas demonstraram serem geneticamente relacionadas em testes de transformação (COLMAN, 1969). Elas possuem uma constituição de açúcar da parede celular distinta, da qual raminose está ausente, mas o ácido teicóico ribitol presente (COLMAN & WILLIAMS, 1965). As cepas dessas espécies produzem H₂, não hidrolizam arginina ou esculina e dão reações variadas nos testes de Voges-Proskauer. Algumas cepas produzem glucano extracelular e frequentemente produzem colônias agar sacarose, os quais são indistinguíveis dos demais estreptococos.

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

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

Streptococcus salivarius

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

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

Streptococcus milleri

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

dades de cepas semelhantes a *S. milleri* mas, prefere dividi-las em *S. MG - intermedius* (lactose+) e *S. anginosus-constellatus* (lactose -).

Cepas de *S. milleri* usualmente hidrolizam arginina e esculina e produzem acetoina a partir da glicose. Elas não produzem polissacarídeos extracelulares da sacarose, fermentam manitol ou sorbitol e produzem H₂. Os *Streptococcus milleri* isolados são normalmente resistentes a sulfonamidas e podem crescer em meios seletivos designados por CARLSSON (1967) para o isolamento de *S. mutans* (MEJARE & EDWARDSSON, 1975).

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

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

Métodos quemotaxonômicos não tem sido usados frequentemente em estudos sobre estreptococos orais. COLMAN & WILLIAMS (1965) demonstraram que ocorre uma variedade de padrões de carboidrato da parede celular entre os estreptococos, sendo que, alguns fatos, como por exemplo a ausência

de raminose em *S. mitior* possa ser correlacionada com determinadas espécies em particular. Nas cepas de *S. mutans*, foi observado que diferenças na composição de carboidratos da parede celular estão relacionados com o serotipo (HARDIE & BOWDEN, 1974b). A presença de ácidos graxos em *S. mutans* tem sido examinados por DRUCKER e outros, demonstrando que a presença de tais ácidos estão vinculados às condições culturais, tais como temperatura, idade da cultura, substrato, diluição (em cultura contínua), aeração, pH e concentração de micronutrientes (DRUCKER et al., 1976; DRUCKER & VEAZEY, 1977). A caracterização de células totais em cromatografia, tem sido tentada como um possível método de identificação de estreptococos orais, mas os resultados são ainda bastante limitados, não resultando em um esquema que possa ser usado amplamente (STACK et al., 1973). Outras técnicas, tais como eletroforese e isoeletrofocos de células totais lisadas, podem ser de valor complementar na classificação de estreptococos. Tais técnicas permitem uma análise dos padrões proteicos, que quando utilizadas em cepas representativas de *S. mutans*, demonstram que existem subdivisões entre essas espécies (RUSSEL, 1976).

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

Métodos apropriados para o isolamento e identificação a serem usados na coleta de amostras da boca, dependem muito do lugar ou "habitat" sob investigação (HARDIE & BOWDEN, 1974a, 1976b). A escolha de um método para a inoculação de amostras nas placas em estudos quantitativos, torna-se um problema, já que há o perigo de destruição de cer-

tas bactérias, mas a maioria dos estreptococos sobrevivem aos métodos comumente utilizados, incluindo sonificação, e são geralmente sensíveis à exposição pelo oxigênio. Para estreptococos estritamente anaeróbicos, entretanto, precauções devem ser tomadas para impedir as amostras de serem expostas ao oxigênio atmosférico durante o processo.

Estreptococos orais podem ser isolados em meios não seletivos, como agar-sangue, mas a seleção de colônias de estreptococos quando na presença de demais outros microrganismos, torna-se difícil. O mesmo acontece, quando na distinção de estreptococos de várias espécies, apenas pela observação das colônias nesse meio. Vários meios seletivos foram desenvolvidos para o isolamento de estreptococos da cavidade oral e garganta. Desde que alguns estreptococos produzem polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, os meios em geral incluem concentrações adequadas de sacarose. Em tais meios, cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior* e *S. salivarius* apresentam formas coloniais características, e tais fatos tem sido utilizados como base em investigações epidemiológicas. Entretanto, estudos da morfologia colonial devem ser acompanhados de outros estudos.

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

1976; FACKLAM, 1977).

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

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

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

A serologia é uma técnica que foi introduzida nos laboratórios de pesquisa para auxiliar o trabalho do patologista. Fazendo-se uma leitura dos trabalhos publicados no início desse século, verifica-se que o desenvolvimento de tal técnica parece ter-se originado da necessidade de se ter uma ferramenta auxiliar no trabalho de identificação e

T A B E L A 2

Algumas reações fisiológicas de estreptococos encontrados na boca.

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

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

* Variações relatadas por diferentes autores.

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

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

caracterização de agentes patogênicos (DIERNHOFER, 1930; MINNETT, 1931; SEELEMANN, 1930), que do ponto de vista prático tem a função de identificar tais agentes coordenando em grupos as variadas e complexas formas microbianas observadas na flora oral humana (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971; SOLOWAY, 1972) classificando essas formas de maneira a permitir o reconhecimento de suas múltiplas relações de afinidade.

A idéia de desenvolver e aplicar tais técnicas serológicas com o objetivo de contribuir na identificação e caracterização de microrganismos orais, particularmente estreptococos hemolíticos, parece ter-se concretizado com os trabalhos levados a efeito por LANCEFIELD (1925, 1933), cujos resultados demonstraram ser um sistema útil para a identificação de estreptococos hemolíticos patogênicos no homem e animais, baseados na presença de antígenos específicos desses estreptococos. A técnica desse autor, a qual divide as bactérias em 17 grupos (A, H, K e S), tem sido visto como, sem dúvida nenhuma, ser um excelente e realizável método de identificação de que se dispõe (COLMAN & WILLIAMS, 1967). Para o grupo viridans do qual muitos dos estreptococos orais pertencem, não foi detectado ainda um sistema equivalente. Tal aspecto, parece estar relacionado com o facto de que tais microrganismos, quando injetados em animais experimentais não são capazes de induzir a formação de quantidades adequadas de anticorpos, ou se o fazem, dão origem à formação de anticorpos inespecíficos incapazes de estabelecer relações de afinidade (LANCEFIELD, 1925; GUGGEMHEIM, 1968; PORTIFIELD, 1950; SELBIE et al., 1949; SHERMAN, et al., 1943; SOLOWAY, 1942).

Tais resultados iniciais, sugerem que os estreptococos viridantes e os não hemolíticos são antigenicamente heterogêneos. Esses estudos preliminares resultaram ineficazes, provavelmente pela ausência de uma base taxonômica clara, da qual se iniciam as investigações serológicas. A medida que aumenta o conhecimento de novas espécies bem

definidas, tem sido demonstrada a possibilidade de um conhecimento maior inter e intra específico, do ponto de vista serológico.

A atenção de diversos pesquisadores ligados a área de Biologia Oral, particularmente os serologistas, tem sido a de desenvolver e aplicar técnicas serológicas com o intuito de contribuir na identificação e caracterização desses microrganismos orais. Assim a existência de diferenças serológicas entre "strains" de *S. mutans* foi primeiramente observada por ZINNER & JABLON (1968) e CROUSAZ & GUGGENHEIM (1966). Posteriormente BRATTALL (1970) relatou a presença de 5 tipos serológicos distintos (originalmente denominados grupos) entre as espécies. Esses serotipos, designados de (a - e), foram demonstrados por imunoeletroforese e imunodifusão com extratos antigênicos. As cepas determinadas serotipo (e) reagiram positivamente com o grupo E de Lancefield, da mesma forma que cepas de *S. uberis* (CULLEN, 1967). Ficou demonstrado que o *S. mutans* tipo antigênico (e) não é idêntico ao grupo antigênico E de Lancefield (LINZER, 1976; PERCH et al., 1974).

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

Estudos detalhados da composição antigênica e o relacionamento serológico entre os estreptococos orais (HAR

DIE & MARSH, 1978) tem sido realizados com o objetivo de se desenvolver e padronizar técnicas serológicas de precipitação. Esses estudos, feitos em *S. mutans*, tem sido baseados em: 1) confirmação da natureza antigênica de carboidratos de parede celular dos serotipos, não somente entre poucas cepas, mas também às demais, após isoladas; 2) estandarização do método para a produção de antissoros contra esses antígenos de carboidratos; 3) comparação de várias técnicas de extração desses antígenos e 4) estudo e análise das reações cruzadas com antígenos resultantes das várias técnicas de extração empregadas. Estudos preliminares demonstraram que extratos em autoclave de células total promovem reações específicas com antígenos de carboidratos de *S. mutans* (homólogos) reagem com demais serotipos de *S. mutans* e outras espécies (MARSH et al., 1975, 1977).

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

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

Estudos epidemiológicos em vários grupos de populações demonstraram variações na distribuição de serotipos de *S. mutans*, porém, os tipos c e d parecem ter uma pre

valência maior em várias comunidades examinadas (BRATTHALL, 1972; HAMADA et al., 1976; QUERESCHI et al., 1977).

Com relação ao *S. sanguis*, na original subdivisão serológica feita por WASHBURN (1946), tres tipos foram descritos (I, II e I/II) mas não foi identificado nenhum grupo antigênico comum. As cepas pertencentes ao tipo II, são agora consideradas como pertencentes a uma espécie separada, *S. mitior*. O relacionamento entre *S. sanguis* e os estreptococos do grupo H (HARE, 1935) tem sido visto por muitos pesquisadores, mas muitas questões estão ainda pendentes (COLMAN, 1970; COLMAN & WILLIAMS, 1972; HARDIE, 1975). Estudos sobre a parede celular de cepas de *S. sanguis* do ponto de vista da composição polissacarídica através de reação de aglutinação (excluindo aqueles agora mencionados como *S. mitior*) indicaram a existência de pelo menos dois ou tres tipos distintos, os quais não podem ser distinguidos do ponto de vista fisiológico (HARDIE, 1975).

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

Problemas de ordem prática ainda persistem com relação à identificação de estreptococos do grupo H, levando-se em conta que a escolha de cepas para imunização nos

produtores de anti-soros comerciais não tem sido padronizados. Dessa forma, a caracterização de estreptococos do grupo H (Inglês) não pode ser comparado com pertencentes ao mesmo grupo H (Americano).

Várias referências tem sido feitas entre *S. mitior* e *S. sanguis*, do ponto de vista fisiológico, serológico no que diz respeito a parede celular, mas há poucas informações disponíveis com relação a estrutura antigênica do *S. mitior*. KALONAROS & BAHN (1965) descrevem dois grupos serológicos entre cepas, identificados como *S. mitior*, mas desde que todas as cepas examinadas possuem glicose e ramnose na sua parede celular, elas sugerem não serem as mesmas, portanto, denominadas como *S. mitior*, definido por COLMAN & WILLIAMS (1972). Algumas cepas de *S. mitior* dão reações positivas em testes de precipitação com soro do grupo de Lancefield O, M e K e recentemente algumas reações cruzadas com o soro do grupo B tem sido observadas isoladamente, com alguns tipos de animais (COLMAN, 1976).

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

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

Embora a espécie *Streptococcus milleri* seja fisiologicamente heterogênea, parece possuir um grau considerável de heterogeneidade serológica e reações cruzadas po-

dem ocorrer com os soros dos grupos A, C, F, G e K de Lancefield, (COLMAN, 1976). Nos estudos realizados por PARKER & BALL (1976), 81 cepas foram identificadas como *S. milleri*, das quais 5 reagiram com o grupo A, 5 com o grupo C, 3 com o grupo G e 7 com o grupo F. Estudos comparativos feitos por FACKLAM (1977) demonstraram que de 231 cepas pertencentes as espécies S.M.G. - intermedius, nove reagiram com o grupo A, seis com o grupo C, 53 com o grupo F, tres com o grupo G, duas com o grupo K e seis com o soro do grupo A variante. Cepas de *anginosus constellatus* promoveram reações com o soro dos grupos A, C, F, e G.

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

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

Do ponto de vista da distribuição desses estreptococos na flora oral, sabe-se que essa distribuição não possui uma localização específica, mas sim que varia de re-

gião para região na bôca. Dessa forma, por exemplo, o *S. salivarius* é encontrado em grande número na superfície dorsal da língua e na saliva, enquanto que na placa dentária se apresenta em pequenas proporções (KRASSE, 1954; SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971). O "habitat" natural do *S. mutans* parece ser a superfície dental, mas são também normalmente encontrados fazendo parte da placa dentária (GIBBONS et al., 1974). Baseando-se em vários relatos de publicação a respeito dessa distribuição (GIBBONS & VAN HOUTE, 1975b; GOLD et al., 1975; MEJARE & EDWARDSSON, 1975; CARLSSON, 1967; LILJEWARK & GIBBONS, 1972), a tabela 3 apresenta uma distribuição de estreptococos na cavidade oral.

Alguns fatores ecológicos podem ser significantes na determinação da distribuição dessas diferentes bactérias na cavidade oral. Uma das propriedades que tem recebido bastante atenção é a habilidade de várias espécies em aderir a diferentes tipos de superfície (GIBBONS & Van HOUTE, 1975b).

A natureza complexa da flora oral, tem despertado interesse dos pesquisadores com relação às possíveis interações (estimulatória e inibitória) que podem ocorrer entre microrganismos, as quais podem influenciar a composição, atividade metabólica e conseqüentemente a patogenicidade da flora num determinado sitio específico da cavidade oral.

Os estreptococos orais são capazes de sintetizar uma variedade de glucanos e frutanos a partir da sacarose. Levanos derivados de *S. salivarius* são rapidamente metabolizados na placa bacteriana (WOOD, 1964; PARKER & CREAMER, 1971; LEACH et al., 1972). Cerca de 50% de 28 isolados recentes (Van HOUTE & JANSEN, 1968) e 37% de 57 isola-

T A B E L A 3

INCIDÊNCIA DE ESPÉCIES DE ESTREPTOCOCOS NA CAVIDADE ORAL

ESPÉCIES	INCIDÊNCIA				
	Saliva	Língua	Bocheca	Placa	Sulco Gengival
<i>S. salivarius</i>	alta	alta	baixa ou moderada	baixa	baixa
<i>S. mitior</i> (<i>mitis</i>)	alta	alta	alta	alta	moderada
<i>S. sanguis</i>	moderada	baixa ou moderada	moderada	alta	moderada ou alta
<i>S. milleri</i>	baixa	baixa	baixa	moderada	alta
<i>S. mutans</i>	baixa	baixa	baixa	usualm/e baixa algumas vezes alta	moderada
Enterococos	baixa	baixa	baixa	baixa	baixa

Alta = 15% do total de bactérias; Moderada = 4-15% do total de bactérias; Baixa = 4%
Baixa = 4% do total de bactérias.

dos de estreptococos orais (De COSTA & GIBBONS, 1968) foram capazes de metabolizar levano de *S. salivarius*. Tem sido considerado que o catabolismo de levanos contribuem para o prolongamento da presença de ácido na placa (MANLY & RICHARDSON, 1968). De fato, levanos de *S. salivarius* e a amilopectina derivada de cepas de *neisseria* foram utilizados mais rapidamente que a sacarose por estreptococos orais e cepas de *Lactobacillus* (PARKER & CREAMER, 1971). Entretanto, glucanos de estreptococos parecem não serem rapidamente utilizados por bacterias orais (WOOD, 1969; PARKER & CREAMER, 1971), embora recentemente NAKAMURA et al. (1976) demonstraram que 18 isolados recentes designados *Bacteroides ochraceus* possuem atividade metabólica em relação a poliglucanos. MIKX et al. (1976) estudaram as interações de uma exo-dextranose produzida por *S. mutans* OMZ 176 e uma endo-dextranase produzida por *S. mitis* S3, na hidrolise da dextrana em culturas puras e mistas. Grande produção de ácido foi observada em culturas mistas, sugerindo um relacionamento simbiótico entre estreptococos. As implicações "in vivo" de uma atividade metabólica intensa e conseqüentemente intensa atividade cariogênica devido à essa interação sinérgica, foi testada em ratos gnotobiotos. Entretanto, diferenças não foram verificadas em ratos inoculados com tais estreptococos em conjunto ou isoladamente. Possivelmente, tal fato se verificou devido a inacessibilidade da dextrana à hidrólise.

Recentemente SCHACHTELE et al. (1976) fizeram uma revisão da literatura em relação a produção de dextrana por bactérias orais, como o *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Actinomyces israeli*, *Bacteroides ochraceus*, e *Fusobacterium fusiformis*, demonstrando que tais bactérias possuem tanto exo como endo atividade hidrolítica.

Em uma série de artigos, CARLSSON (1970a, b, 1971a, 1972) descreveu os requerimentos para o crescimento

das espécies *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. salivarius*. Ele demonstrou que sob condições anaeróbicas as cepas de *S. mutans* requerem ácido p-aminobenzóico para o seu crescimento, e que em sistemas de culturas mistas livres desse fator de crescimento, as cepas de *S. sanguis* foram capazes de crescer em conjunto com cepas de *S. mutans* (CARLSSON, 1971b).

Um outro produto final do metabolismo de estreptococos é o ácido láctico, o qual acredita-se ser responsável pela desmineralização do esmalte dentário. *Veillonellae*, os quais ocorrem normalmente na placa dentária, são incapazes de metabolizar a glicose, mas podem fermentar lactato. O relacionamento simbiótico "in vitro" tem sido demonstrado entre *S. mutans* e *Veillonella alcalescens* (MIKX & Van der HOEVEN, 1975). Em cultura continua mista, *V. alcalescens* degradou todo o lactato produzido pelo *S. mutans* a partir do metabolismo da glicose. Essas observações possuem implicações, desde que esse tipo de interação pode contribuir para reduzir o efeito do lactato. Alguma evidência para isso foi obtida, usando-se combinações de *S. mutans*, *S. sanguis* e *V. alcalescens* em animais gnotobiotos (MIKX et al., 1972). Menas cárie foi detectada em animais infectados com culturas mistas de estreptococos com cepas de *Veillonella* quando comparadas com animais infectados com esses microrganismos separadamente. Tais observações foram relatadas recentemente por MIKX et al. (1976). A combinação desses estudos de interrelação microbiana sob condições definidas, verificando-se o significado dos mesmos "in vivo" e "in vitro" usando-se animais gnotobiotos, indicaram serem de fundamental importância para o entendimento das interações microbianas.

Poucas tentativas tem sido feitas para o estudo das interações de microrganismos da cavidade oral, particularmente da placa dentária, no quemostato. Provavelmente

seja devido a um complexo e conseqüentemente pobre entendimento sôbre a teoria a respeito do crescimento contínuo em cultura mista. Entretanto, ELLWOOD et al. (1972) relata algumas experimentações em quemostato com material de placa dentária. Os dados coletados porêem, foram predominantemente bioquímicos (ELLWOOD & HUNTER, 1976). Estudos do ponto de vista bioquímico e bacteriológico combinados de placa dentária sob condições controladas, seriam de grande valor. Tais estudos permitiriam o reconhecimento dos importantes fatores ecológicos no contrôle do balanço da flora oral.

PARKER (1970) fez estudos com combinações de sete bactérias orais em culturas. Enquanto nenhuma das espécies inibia ou estimulava as outras, o último beneficiário eram cepas de estreptococos. Entretanto, a natureza dessas interações inibitórias e estimulatórias não foi determinada.

Muitos exemplos "in vitro" de antagonismo entre membros da flora oral foram descritos. De fato, os primeiros pesquisadores estavam preocupados em utilizar tal fenômeno na prevenção das doenças da cavidade oral (HUGENSCHMIDT, 1896) e na redução da incidência da cárie dentária (SCRIVENER et al., 1950; SCRIVENER, 1955; RUTTER at al., 1961).

Recentemente, tem sido descrito experimentações com agentes antagonistas "in vitro" por vários estreptococos.

Observações feitas com *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior* e *S. salivarius*, demonstraram serem capazes de produzirem concentrações de ácido lático e acético em agar suplementado com glicose, os quais puderam ser inibidores de um grande número de bactérias (DONOGHUE & TYLER, 1975). Peróxido de hidrogênio produzido por *S. sanguis* (HOLMBERG & HALLANDER, 1973; DONOGHUE & TYLER, 1975) e *S. mitior* (LEBIEN & BROMEL, 1975) possuem um amplo espectro de ativi-

dade contra outros cocos gram positivos, incluindo *Lactobacilos* e *Actinomyces sp.* (HOLMBERG & HALLANDER, 1972).

Cepas de *S. salivarius* isoladas de material de garganta foram capazes de inibir o crescimento de um grande número de estreptococos, estafilococos, corinebacterias e algumas vezes peptococos e peptoestreptococos (BILL & WASHINGTON, 1975). Entretanto, a causa dessa inibição, não pode ser determinada.

A produção de bacteriocinas e substâncias tipo bacteriocinas, tem sido detectado "in vitro" com cepas de *S. mutans* (KELSTRUP & GIBBONS, 1969a; ROGERS, 1972, 1976 ; YAMAMOTO et al., 1975; HAMADA & OOSHIMA, 1975), *S. sanguis* (SCHLEGEL & SLADE, 1972; DONOGHUE & TYLER, 1975; KOLSTAD , 1976; DAJANI et al., 1976a) e *S. mitis* (DAJANI et al., 1976a; VERNAZZA & MELVILLE, 1977).

A subdivisão das cepas de estreptococos através do estudo das bacteriocinas para aplicação em estudo epidemiológicos, além da serologia, tem sido proposto por muitos pesquisadores (KELSTRUP & GIBBONS, 1969a; BERKOWITH & JORDAN, 1975; ROGERS, 1975; KOLSTAD, 1976). Utilizando tal sistema (ROGERS, 1975) observaram o mesmo tipo de bacteriocina de *S. mutans* em todos os membros de uma família em particular, sendo que esse tipo não foi encontrado em outro tipo de material. Também, ROGERS (1975) observou que somente um tipo de bacteriocina de *S. mutans* predominam na boca. KELSTRUP et al. (1970) marcaram cepas de *S. salivarius*, demonstrando a transferência desse microrganismo da mãe para o recém-nascido.

Com pequenas exceções, a atividade de bacteriocina somente pode ser demonstrada em agar, e muitos pesquisadores tem tido dificuldade em isolar o agente ativo. Entretanto, DAJANI et al. (1976a.b) teve sucesso em isolar, caracterizar e purificar substâncias tipo bacteriocinas de

duas cepas de *S. mitior* e uma cepa de *S. sanguis* pelo rompimento da célula. Outros métodos incluindo sonicação de células totais, congelamento e inibição em placa de agar, falharam no conhecimento do agente ativo. Essas substâncias foram observadas serem únicas entre bactérias gram positivas, as quais inibiram muitos microrganismos gram negativos incluindo *Neisseria spp.*

Outras bactérias gram negativas da cavidade oral, como *Veillonella* e *Bacterioides* não foram testadas.

Todas essas substâncias denominadas bacteriocinas ou tipo-bacteriocinas possuem atividade para inúmeros estreptococos de placa dentária, e algumas possuem ampla atividade contra outras bactérias da cavidade oral. Por exemplo, substâncias tipo bacteriocina proveniente de cepas de *S. mitis* se mostraram ativas contra cepas de *S. mutans*, *S. sanguis*, *Actinomyces naeslundii*, *Rothia dentocariosa* e esta filococos da cavidade oral (VERNAZZA & MELVILLE, 1977). Tem sido verificado que a habilidade de produzir tais inibidores, podem conferir uma vantagem ecológica para esses microrganismos. Entretanto, devido ao fato de que as observações de tais mecanismos terem sido efetuadas até o momento "in vitro", o seu significado "in vivo" está ainda no campo especulativo. As evidências da atividade de bacteriocinas em placa, são ainda pouco conhecidas. Os relatos iniciais indicaram que algumas bacteriocinas de *S. mutans* são inativadas por enzimas proteolíticas da saliva (KELSTRUP & GIBBONS, 1969b) e que cepas sensíveis a bacteriocinas de *S. mutans* e *S. salivarius* tornam-se resistentes quando o seu crescimento se dá em presença de sacarose devido à produção de polissacarídeos extracelulares (ROGERS, 1974). Reciprocamente, DELISLE (1976) observou que bacteriocinas foram produzidas por cepas de *S. mutans* BHT e GS-5 e comparadas com cepas sensíveis indicadoras em meio contendo sacarose, verificando que a saliva humana não interferiu na atividade da

bacteriocina.

Recentemente, Van der HOEVEN et al. (1977) de monstrou possibilidade de demonstração "in vivo" da atividade de antagonista. Ratos gnotobiotos foram tratados com cepas bacteriocina-sensitivas de *Actinomyces viscosus* (Ny-1), e também com cepas de *S. mutans* bacteriocinas produtoras (C67-1, ou T2) ou não produtoras (OMZ-176). As cepas bacteriocina-produtoras impediram a colonização por *A. viscosus* Ny-1, enquanto que o mesmo se tornou estável quando infectado com os demais agentes. Os autores sugerem que bacteriocinas podem ser de importância fundamental para a placa, mas não necessariamente levam à eliminação de cepas susceptíveis do local.

Relatos preliminares acêrca de um estudo longitudinal de microrganismos da placa, demonstraram que algumas cepas de *S. mutans* são capazes de aumentar em número durante um período de 13 semanas (BOWDEN et al., 1976; HARDIE et al., 1977). A habilidade dessa espécie, de dominar dessa forma, o crescimento quando em competição com um grande número de diferentes bactérias, possui um grande significado ecológico. A possível produção "in vivo" de bacteriocinas por tais cepas é uma explicação desse fenômeno, atualmente em estudos.

Os estreptococos orais estão frequentemente envolvidos em processos infecciosos da bôca, como a cárie dentária, abcessos dentários, e também, implicados em infecções em outros lugares do organismo (bacteriemia dentária, endocardite bacteriana e outras infecções sistêmicas). Tais microrganismos usualmente alcançam lugares distantes do organismo via corrente sanguínea, podendo ser considerados como patógenos oportunistas, promovendo doenças quando eles não estão em seu habitat natural.

A cárie dentária é uma doença localizada, pro-

gressiva, que se inicia pela desmineralização da superfície externa do dente devido a ácidos orgânicos produzidos localmente por bactérias que fermentam depósitos de carboidratos da dieta. Baseando-se na observação de que bactérias da cavidade oral podem produzir ácidos "in vitro", suficientes para a descalcificação do esmalte do dente, MILLER (1890) estabeleceu sua teoria quimio-parasitária para o conhecimento da etiologia da cárie. Foi possível observar, já naquela época que as bactérias se acumulavam na superfície dental na forma de uma "placa dentária", sendo esse processo um importante fator na etiologia da cárie dentária.

Muitas das bactérias comumente presentes na placa dentária são sacarolíticas e dessa forma potencialmente patogênicas para os dentes. Os estreptococos e os actinomicetos estão invariavelmente presentes em elevados números na placa supragengival, sendo que lactobacilos podem também serem encontrados, embora seu número seja usualmente baixo (BOWDEN et al., 1975).

Experiências com animais gnotobiotos, revelaram fundamentalmente o potencial cariogênico de bactérias específicas. ORLAND et al. (1955), demonstraram que ratos tidos como "germ-free" permaneceram livres de cárie quando submetidos a uma dieta rica em sacarose, por outro lado, animais inoculados com enterococos e substâncias proteolíticas, desenvolveram cárie. Muitos trabalhos posteriores demonstraram que a cárie pode ser induzida em animais experimentais com determinados estreptococos e que a doença pode ser transmitida de um animal para outro (KEYS, 1960; FITZGERALD, 1968).

Muitas das cepas de enterococos, os quais demonstraram serem cariogênicos para animais, pertencem a espécie *Streptococcus mutans* e a cárie pode ser induzida por esse microrganismo em ratos, hamsters e macacos. O *S. mutans*

foi originalmente isolado de cárie humana por CLARKE (1924). O mecanismo de cárie em animais experimentais envolve as fissuras e superfície lisas dos dentes e normalmente resulta de uma quase completa destruição do tecido duro. Não se tem mencionado diferenças detectáveis na cariogenicidade entre diferentes tipos de estreptococos, mas parece que a patogenicidade pode estar relacionada com a capacidade de determinadas cepas em produzir polissacarídeos extracelulares insolúveis. Certas cepas que perderam tal capacidade, demonstram uma atividade cariogênica bem menor (de STOPPELAAR et al., 1971; TANZER et al., 1974; MICHALEK et al., 1975). A virulência das cepas de *S. mutans* podem estar relacionadas com a habilidade de produzir polissacarídeos intracelulares (TANZER et al., 1976).

Nas experiências de indução de cárie em animais, normalmente emprega-se dieta rica em sacarose, a qual contribue efetivamente para o estabelecimento de *S. mutans* na cavidade oral. Entretanto, animais mantidos em dietas contendo outros carboidratos, podem desenvolver cárie (COLMAN et al., 1977).

Embora tem sido amplamente divulgado que a espécie *S. mutans* é altamente cariogênica para animais, outras espécies de estreptococos e até mesmo outros gêneros, podem induzir cárie. Assim, algumas espécies de estreptococos como *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. milleri* e enterococos, assim como também actinomicetos e algumas espécies de lactobacilos, tem demonstrado certa atividade cariogênica em animais gnotobiotos. Os níveis de cárie produzida por esses microrganismos é normalmente menor quando comparado com *S. mutans*, e geralmente está limitada as fissuras oclusais do dente (GIBBONS & van HOUTE, 1975b).

Dessa forma, os estudos de indução de cárie em animais por estreptococos, demonstram haver diferenças sig-

nificativas entre esses microrganismos, dos quais *S. mutans* parece ser o mais patogênico. Alguns estreptococos parecem ter uma habilidade diferente em colonizar certos animais, é o caso de *S. sanguis*, o qual pode se estabelecer bem em ratos, mas não em hamsters (KRASSE & CARLSSÖN, 1970). Pesquisas recentes tem demonstrado que a inoculação de misturas de bactérias em animais gnotobiotos, podem modificar a capacidade cariogênica de determinadas cepas, quando na presença de outros microrganismos como *Veillonella alcalescens* - (MIKX et al., 1972, 1976).

Desde que se demonstrou a capacidade cariogênica de *S. mutans*, inúmeros pesquisadores tem voltado a sua atenção para a associação entre esses estreptococos e cárie em humanos. Devido ao fato de que a cárie normalmente se desenvolve em partes inacessíveis do dente, como fissuras, orifícios e entre a junção dos dentes, um diagnóstico preventivo se torna difícil. Quando se é possível detectar a cárie, tal processo cariogênico se acha bastante adiantado, onde a flora bacteriana presente pode não ser a mesma quando comparada com o início do processo (HARDIE & BOWDEN, 1976c) Assim, devido a tais problemas de diagnóstico nos estágios iniciais do processo, torna-se difícil a avaliação dos fatores microbiológicos que estão associados com o início da doença.

Do ponto de vista epidemiológico, os dados obtidos da presença ou ausência de cárie e conseqüentemente a correlação com os tipos de bactérias presentes, parecem estar condicionados a determinados fatores. Em alguns estudos a prevalência ou a frequência de isolamento de algumas espécies, pode estar relacionada com a frequência de cárie na população, quando a investigação ocorre num determinado momento. Numerosos estudos nessas circunstâncias tem demonstrado uma associação entre a presença e número de *S. mutans* com o nível de perda, ausência e obturação dos dentes (KRAS

SE et al., 1968; JORDAN et al., 1969; HOERMAN et al., 1972; LITTLETON et al., 1970; SCHAM SCHULA & BARMES, 1970; ROGERS 1973; SHKLAIR et al., 1974; GIBBONS et al., 1974; LOESCHE et al., 1975). Parte desses estudos demonstraram que a correlação entre *S. mutans* e cárie foi melhor observada em placa dentária de superfícies individuais dos dentes, quando comparadas com a análise da saliva ou de um "pool" de material de placa dentária (LOECHE et al., 1975).

Exceções na associação entre *S. mutans* e cárie foram detectadas em muitos estudos. Assim em muitos casos o processo cariogênico foi observado em lugares onde não se detectou a presença de *S. mutans* e contrariamente, nem todas as superfícies infectadas mostraram sinais de cárie.

Alguns tipos de estudos epidemiológicos, se apresentam mais apropriados ao estudo do desenvolvimento da cárie. Em tais estudos, a população é examinada após um período de meses ou anos, onde o desenvolvimento da cárie pode ser acompanhada clinicamente e radiograficamente. A amostra para a análise microbiológica pode ser coletada periodicamente de regiões cariogênicas dos dentes e os resultados correlacionados com a incidência da doença nesses sítios particulares. Esses estudos são muito trabalhosos e custosos para serem realizados, e por essa razão se tornam impróprios.

Inúmeras evidências entre o relacionamento de *S. mutans* e o desenvolvimento da cárie dentária foi relatada (EDWARDSSON et al., 1972; IKEDA et al., 1973; KEENE & SHKLAIR, 1974; De STOPPELAAR, 1971; WOODS, 1971; SWENSON et al., 1976), embora nem todas as informações publicadas fundamentam tais evidências (MIKKELSEN & POULSEN, 1976).

Estudos que estão sendo realizados e que estão ainda em progresso, demonstram não haver ainda, uma clara evidência no aumento de espécies microbianas individuais pre

liminarmente a detecção de cárie em regiões específicas dos dentes, quando observado em grupos de escolares após dois a nos de observação (BOWDEN et al., 1976; HARDIE et al., 1977). Somente poucas regiões que desenvolvem cárie não demonstram a presença de *S. mutans*. Esses estudos envolvem um exame regular de amostras de placas de 100 regiões cariogênicas em 50 crianças, estando, portanto, ainda num estágio preliminar, cujo relato dos resultados obtidos, requer uma análise mais acurada. Entretanto, os resultados obtidos até o momento, sugerem que o desenvolvimento de cárie, dependem da combinação de fatores microbianos do que a presença ou ausência de uma espécie em particular, como *S. mutans*.

Embora existam evidências da participação efetiva de *S. mutans* no processo cariogênico como um fator principal, os dados obtidos parecem sugerir, que pelo menos, esse microrganismo se apresenta como um dos importantes agentes etiológicos. Há também, evidências imunológicas demonstrando a presença de concentrações razoáveis de anticorpos contra substâncias antigênicas de *S. mutans* no decorrer dos processos cariogênicos (LEHNER, 1975).

A cárie dentária está entre as mais importantes doenças da população brasileira. Além de ser dispendioso o seu tratamento, está associado a inexistência de métodos de prevenção eficazes, já que tais métodos usados até o momento no controle dessa doença tem se mostrado ainda ineficientes e inviáveis, principalmente em escala nacional. O sucesso de prevenção de algumas doenças através da imunoterapia, tem induzido os pesquisadores a trabalhar nesse campo, na esperança de que, a cárie dental sendo uma doença infecciosa, possa também ser prevenida por uma vacina. Experimentos tem sido realizados com animais como primatas e roedores, desenvolvendo-se vários tipos de vacinas, incluindo células totais, parede celular e preparações enzimáticas como antígenos. Algum sucesso tem sido conseguido com roedo-

res, mas melhores resultados tem sido relatados com macacos (BOWEN, 1969; BOWEN et al., 1975; LEHNER et al., 1976; CALDWELL et al., 1977). Muitos desses relatos com vacinas anticárie tem sido revistos recentemente (BOWEN et al., 1976). Parece claro, que investigações mais acuradas sejam realizadas antes de se iniciarem investigações de natureza clínica.

Estreptococos viridantes são frequentemente isolados de infecções de canal dental e são também os organismos mais comumente isolados de pus em cavidade oral (SIMS 1974). Na maioria das publicações, não se tem verificado tentativas de identificar tais microrganismos a nível de espécie. SIMS (1974) indicou que muitos dos isolados assemelham-se à *S. mitior*, e em menor número ao *S. sanguis*.

Informações a respeito da distribuição de espécies individuais em vários locais da cavidade oral comumente infectados, tais como abscessos dentais, bôlsas periodontais, pericoronites e cavidades secas, é bastante limitada até o momento. Levando-se em conta que o conhecimento da identidade de tais microrganismos não afetariam o tratamento clínico de tais infecções, tais observações passam a ter apenas um sentido acadêmico. Entretanto, em vista do envolvimento em potencial do *S. milleri* afetando outras regiões do organismo, seria interessante que estudos fossem feitos em relação à distribuição dessas espécies em detalhes. O isolamento de *S. milleri* de infecções de canal dental (MEJARE & EDWARDSSON, 1975), cáries dentais profundas (EDWARDSSON, 1974) e abscessos dentais (GUTHOF, 1956) tem sido relatado, mas a frequência com que esses estreptococos ocorrem em infecções orais não é conhecida até o momento.

Através de investigações preliminares realiza-

das por OKELL & ELLIOT (1953), tem-se o conhecimento da existência de bacteremia após a extração dentária. Estudos detalhados em tais casos, tem sido levado a efeito por outros pesquisadores, desde observações feitas por JOKINEN (1970). Embora as extrações dentais acarretem riscos para essas infecções, bactérias orais podem também serem introduzidas no sangue através de outros procedimentos (LINEBERGER & DE MARCO, 1973). Muitos microrganismos podem estar presentes em tais bacteriemias, mas a presença de estreptococos - tem sido relatada com mais frequência (PHILLIPS et al., 1976; SYMINGTON, 1975). É provável que as limitações existentes nesses estudos preliminares de bacteriemias dentais em isolar outros tipos de microrganismos, principalmente anaeróbicos, estivessem relacionadas com os métodos de culturas então empregadas (CRAWFORD et al., 1974).

Em muitas das publicações sobre estreptococos isolados do sangue após tratamento dental e de pacientes com endocardite bacteriana, não foi possível identificar tais microrganismos a nível de espécie. Muitos dos estreptococos tem sido referido como *S. viridans* o que torna difícil comparações mais detalhadas entre diferentes publicações a esse respeito. Recentemente, cepas de *S. mitior*, estreptococos viridantes intermediários e *S. milleri* são os mais comumente isolados de pacientes, após extrações dentárias. O *Streptococcus sanguis* e *S. mutans* tem sido encontrado menos frequentemente, enquanto que não tem sido feita nenhuma menção à presença de cepas de *S. salivarius* ou enterococos (PHILLIPS et al., 1976).

O significado da bacteremia, qualquer que seja a origem da bactéria, é que pacientes com predisposição, podem desenvolver endocardite infecciosa. Nessa condição, as bactérias colonizam a superfície das válvulas do coração propiciando amplas vegetações bacterianas. Pacientes com tal risco incluem aqueles com problemas reumáticos do cora-

ção, anormalidades congênitas de vários tipos e após cirurgia cardíaca, especialmente após a inserção de válvulas cardíacas. Tem sido observado que uma grande variedade de microrganismos podem causar endocardite infecciosa, mas os estreptococos são os mais comumente envolvidos. Na forma subaguda da moléstia, os estreptococos são os do tipo viridantes ou não hemolíticos.

Recentemente, importantes pesquisas sobre estreptococos isolados de endocardite bacteriana e outros tipos sistêmicos, tem sido relatados (PARKER & BALL, 1976; FACKLAM, 1977), demonstrando que os estreptococos mais frequentemente isolados foram *S. sanguis* e *S. mitior*. Essas duas espécies juntas, constituem cerca de 60% das cepas de microrganismos, confirmando observações preliminares de vários pesquisadores (WHITE & NIVEN, 1946; HEHRE, 1948; PORTERFIELD, 1950; FARMER, 1953). A espécie seguinte mais comum foi o *S. mutans* encontrado em quase 20% dos casos. Endocardite devido a essa espécie, foi primeiramente observada por ABERCROMBIE & SCOTT (1928) e posteriormente, mais recentemente por PERCH et al (1974); LOCKOOD et al (1974); HARDER et al (1974); NEEFE et al (1974). Cepas de *S. milleri* e *S. salivarius* foram somente isolados, em alguns casos de endocardite. As observações de PARKER & BALL (1976) incluem um significativo número de enterococos e *Streptococcus bovis*, os quais não foram incluídos nos estudos de FACKLAM. O *Streptococcus bovis* não fazem parte da flora oral humana e embora enterococos sejam encontrados em pequeno número na cavidade oral, é muito provável que espécies pertencentes ao grupo D de Lancefield envolvidos em casos de endocardite provenham de outras áreas do organismo e não da boca.

Evidências clínicas que implicam microrganismos orais como a causa de endocardite após uma bacteriemia dental, é invariavelmente circunstancial e retrospectiva, levando-se em conta que a doença pode não se tornar aparente

por muitas semanas e até mesmo meses após o seu início. Entretanto, utilizando-se de um modelo animal, descrito originalmente por GARRISSON & FREEDMAN (1970) foi demonstrado que endocardite estreptocócica pode ser reproduzida experimentalmente em coelhos como resultado de manipulações na cavidade oral, como por exemplo uma extração dental (MCGOWAN & HARDIE, 1974). Nesse tipo de modelo, lesões artificiais não infectadas são criadas para a inserção de cânulas no coração antes de introduzir organismos testes na corrente sanguínea. A patologia da endocardite estreptocócica tem sido estudada extensivamente em coelhos como modelo por DURACK e colaboradores (DURACK & BEESON, 1972a,b; DURACK et al., 1974; DURACK, 1975a). Muitos desses estudos experimentais tem sido levados a efeito usando-se cepas dextrana positiva de *S. mitior* (*S. sanguis* II) isoladas originalmente de pacientes com endocardite. Esse modelo foi também empregado para testar a eficácia de métodos quemoterapêuticos e profiláticos (DURACK & PETERSDORF, 1973; DURACK et al., 1974; SOUTHWICK- & SURACK, 1974; PELLETIER et al., 1975; SANDE & IRVIN, 1974; HOOKE et al., 1975). MCGOWAN (1975) demonstrou que cepas de *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. milleri* e *S. faecalis* são capazes de induzir endocardite em coelhos quando administrados em altas doses.

Pesquisas recentes envolvendo estreptococos isolados de uma variedade de casos clínicos indicaram, que estreptococos provenientes da cavidade oral podem estar envolvidos em outras infecções sistêmicas, além de endocardite bacteriana, incluindo lesões purulentas no cérebro, abdome e tórax. Particularmente, *S. milleri* (ou *S. MG-intermedius* e *S. anginosus - constellatus*) foi encontrado em abcessos cerebrais (PARKER & BALL, 1976; FACKLAM, 1977), enquan-

to que estreptococos isolados de material purulento de vários órgãos, indicaram pertencer à espécie *S. milleri*.

O *Streptococcus milleri* foi originalmente denominado em isolados de abscessos dentais e outras infecções ao redor da boca (GUTHOF, 1956). Não se sabe, até o momento, se tal espécie possui outro "habitat" natural além da cavidade oral e trato respiratório.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL

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

2. MÉTODOS

2.1. Semeadura do Material

Amostras liofilizadas dos estreptococos foram inoculadas em meio de tioglicolato (Thioglycollate Medium without indicator, 135C-BBL) adicionado de uma pequena quantidade de carbonato de cálcio, previamente esterilizado a

120°C por 15 minutos, em autoclave. Posteriormente ao inóculo, os tubos foram incubados a 37°C, durante 24-72 horas em jarra tipo Brewer, em condições de microaerofilia, usando-se envelopes de GASPAK, 70304 (BBL).

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

2.2. Conservação das amostras

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

a) Na primeira, as amostras foram inoculadas em meio de tioglicolato, distribuído em camada alta, em tubos de rosca (13X100mm) e adicionado de aproximadamente 0,1g de carbonato de cálcio por tubo. Com as tampas frouxas, os tubos foram incubados em microaerofilia, em jarra tipo Brewer, a 37°C, durante 24-72 horas. Em seguida, os tubos foram removidos da jarra, apertando-se as roscas para evitar a penetração de ar. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente, durante 30 dias, quando a coleção era então renovada.

b) Na outra coleção, as amostras foram estocadas em leite, no "freezer", à temperatura de -20°C. Leite denatado em pó foi dissolvido em água destilada (solução a 10%) e autoclavado a 115°C, por 20 minutos. Para esta estocagem, 2,0 ml de leite foram distribuídos assepticamente em pequenos tubos de rosca (13X45 mm), adicionando-se 0,5ml de crescimento recente da amostra, em meio de tioglicolato(BBL). Esta coleção era renovada a cada 6 meses.

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

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

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

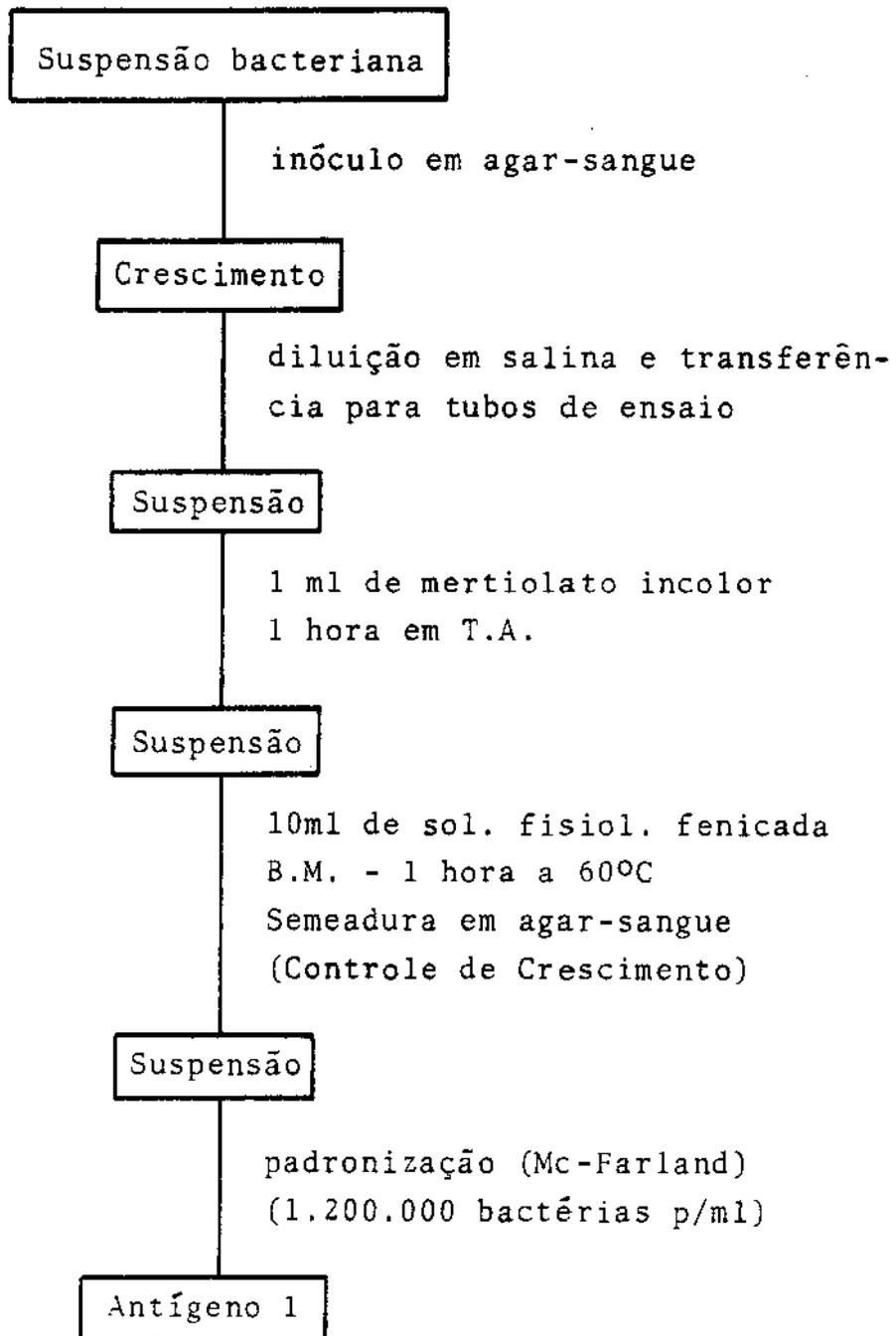
Em ambas as coleções (préviamente a renovação), foram feitos contrôles de pureza, inoculando-se a suspensão bacteriana em placas de agar-sangue e em meio de agar mitis salivarius (BBL), através do método de estria em placa. Posteriormente a sua incubação a 37°C, em microaerofilia, era observada a morfologia colonial do crescimento bacteriano.

2.3. Preparo de antígenos bacterianos para a obtenção de antissoros

Tubos de ensaio com rosca contendo cerca de 10 ml de agar-sangue, foram semeados com a amostra de *Streptococcus sanguis*, e incubadas a 37°C por 24-72 horas. Em seguida, o material bacteriano crescido nos tubos foi suspenso em salina e transferido para um tubo de ensaio estéril. À suspensão resultante, foi adicionado 1 ml de mertiolado incolor, permanecendo 1 hora em T.A. Posteriormente adicionou-se 10 ml de solução fisiológica fenicada e colocou-se em banho-Maria durante 1 hora a 60°C. Após esses procedimentos, semeou-se o material em meio de ágar-sangue para controle de crescimento. O número de bactérias em suspensão foi padronizado pelo método de McFarland, que se baseia no fato de que uma suspensão bacteriana equivalente a 3,4 na escala, corresponde a 1.200.000 bactérias/ml. (antígeno 1). A metodologia empregada no preparo do antígeno 1, baseou-se naquela descrita por BIER (1975) para o preparo de autovacinas, com modificações introduzidas em nosso laboratório (Esquema 1).

À tubos de ensaio contendo meio de cultura de TSB (Trypticase Soy Broth - BBL), foram inoculados material

ESQUEMA 1 - Preparo de antígenos bacterianos para imunização.



bacteriano de *Streptococcus sanguis* (crescido em meio de agar-sangue), permanecendo por 18 horas a 37°C. As células foram centrifugadas, lavadas duas vezes, mantidas em banho-maria a 60°C por 30 minutos e posteriormente ressuspensas em salina numa densidade de cerca de 5.10^8 cels/ml, segundo SEELEMAN & OBIGER (1958) (antígenos 2 e 3). A metodologia empregada no preparo dos antígenos 2 e 3, baseou-se naquela descrita por BRATHALL (1969), com modificações introduzidas em nosso laboratório. As suspensões foram preparadas semanalmente à cada série de injeções (Esquema 2).

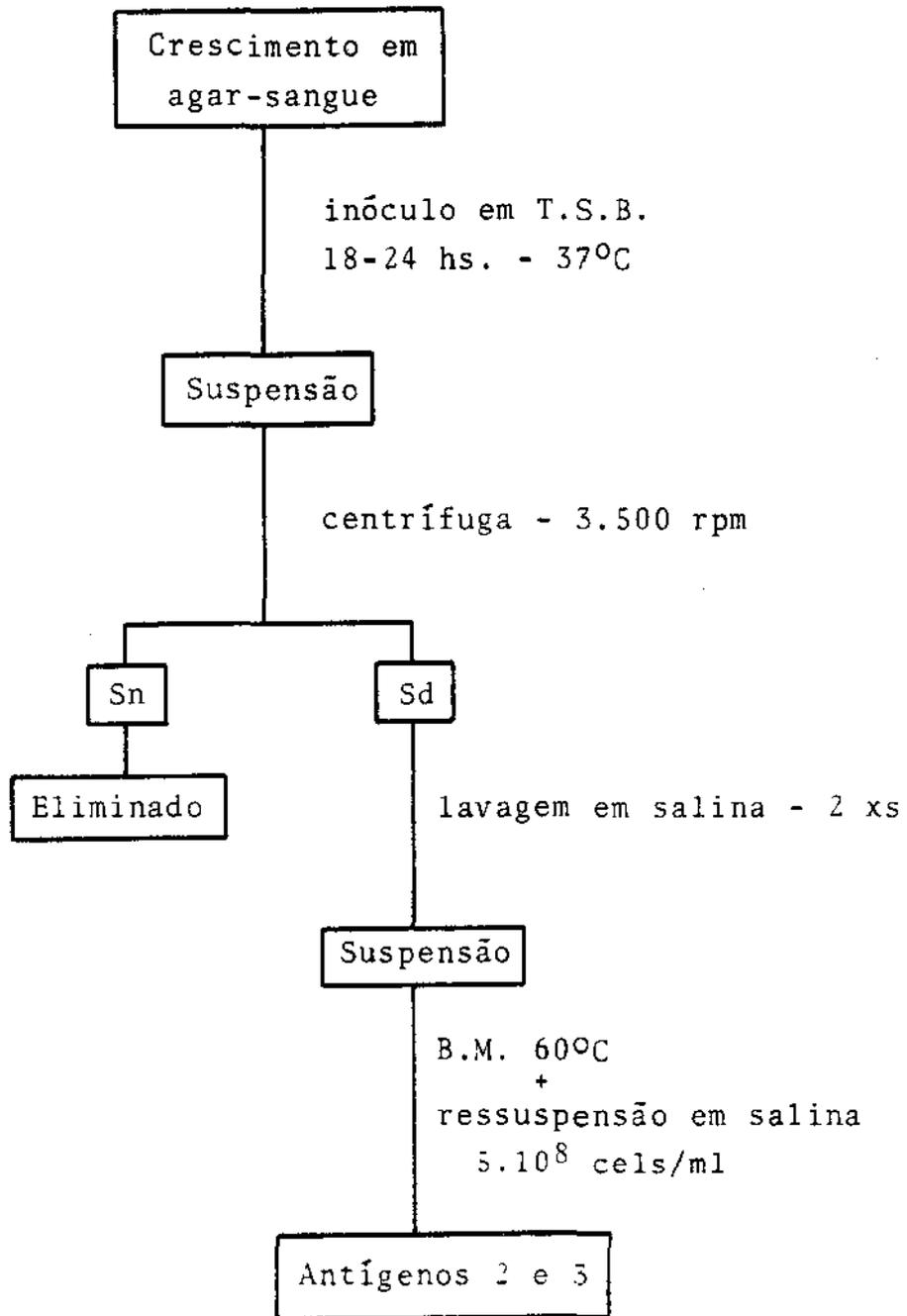
2.4. Inoculações

Foram usados coelhos adultos mantidos em dieta comum. Após a retirada de 5 ml de sangue para a obtenção de soro normal a ser usado como contrôlo, suspensões bacterianas padronizadas, conforme descritas no item 2.3., foram injetados na região próxima ao linfonôdulo (OLIVEIRA, 1975). As injeções foram feitas com os antígenos (antígeno 1) bacterianos emulsionados em Adjuvante de Freund incompleto (25% lanolina + 75% nujol) em partes iguais (V/V) em doses de 1,5 ml da suspensão bacteriana, com intervalos de 15-17 dias entre cada injeção, num total de 2 injeções para cada animal (Quadro 2).

Antissoros para os antígenos descritos no item 2.3 (antígenos 2 e 3) foram obtidos, inoculando-se coelhos adultos mantidos em dieta comum, utilizando-se, respectivamente os seguintes esquemas:

a) Suspensões bacterianas padronizadas, conforme descritas no preparo dos antígenos 2 e 3, foram injeta-

ESQUEMA 2 - Preparo de antígenos bacterianos.



das na veia marginal da orelha em doses de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 ml (sem Adjuvante), com intervalos de 2 dias entre cada injeção. Sete dias após a última injeção, os coelhos foram sangrados por punção cardíaca ou pela veia marginal da orelha do coelho (Quadro 2).

O esquema de imunização empregado para esse tipo de antissoro, baseou-se naquele utilizado por YANO (1976).

b) Outros dois coelhos foram injetados com as mesmas suspensões bacterianas, durante quatro semanas (tres dias consecutivos a cada semana). As tres primeiras injeções foram de 0,5 ml cada e as demais de 1,0 ml de suspensões de células (emulsionadas em Adjuvante de Freund incompleto) preparadas semanalmente e mantidas no congelador (Quadro 2).

O esquema de imunização empregado para esse tipo de antissoro, baseou-se naquele utilizado por BRATTHALL (1969), com modificações introduzidas em nosso laboratório.

2.5. Sangria, preparo e conservação dos antissoros

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

Após a primeira inoculação de antígenos (para o antígeno 1), iniciaram-se as sangrias a intervalos de tempo variados e preparou-se o antissoro (AS). Nos demais esquemas de imunização, as sangrias foram efetuadas após a última injeção de antígeno, conforme o esquema de imunização utilizado (Quadro 2).

Nas sangrias, fez-se um pequeno corte longitu-

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

Antígeno	Coelho nº	nº de injeções do antígeno	Sigla do Antissoro
Ss. ATCC	162	2 (lfn)	AS.Ss.ATCC 162
Ss. ATCC	167	12 (im-1fn)	AS.Ss.ATCC 167
Ss. ATCC	168	7 (i.o.)	AS.Ss.ATCC 168

Ss.ATCC - *Streptococcus sanguis*

AS.Ss.ATCC - antissoro contra *S. sanguis*

2 (lfn) - duas injeções no linfonódulo do coelho

7 (i.o) - sete injeções intravenosa - veia margina da orelha

12 (im - 1fn)- nove injeções intramusculares e 3 injeções no linfonódulo.

dinal na veia marginal da orelha do coelho e recolheu-se o sangue (10 a 30 ml) em um frasco de vidro. O sangue foi deixado de uma a duas horas em temperatura ambiente. Em seguida separou-se o soro centrifugando-se durante 5 minutos a 1.500 rpm (centrífuga Alpha-soro IA). Distribuiu-se o material em vidros (5 ml cada) e adicionou-se Mertiolado numa concentração final de 1:10.000.

2.6. Preparo de antígenos utilizados nos testes serológicos

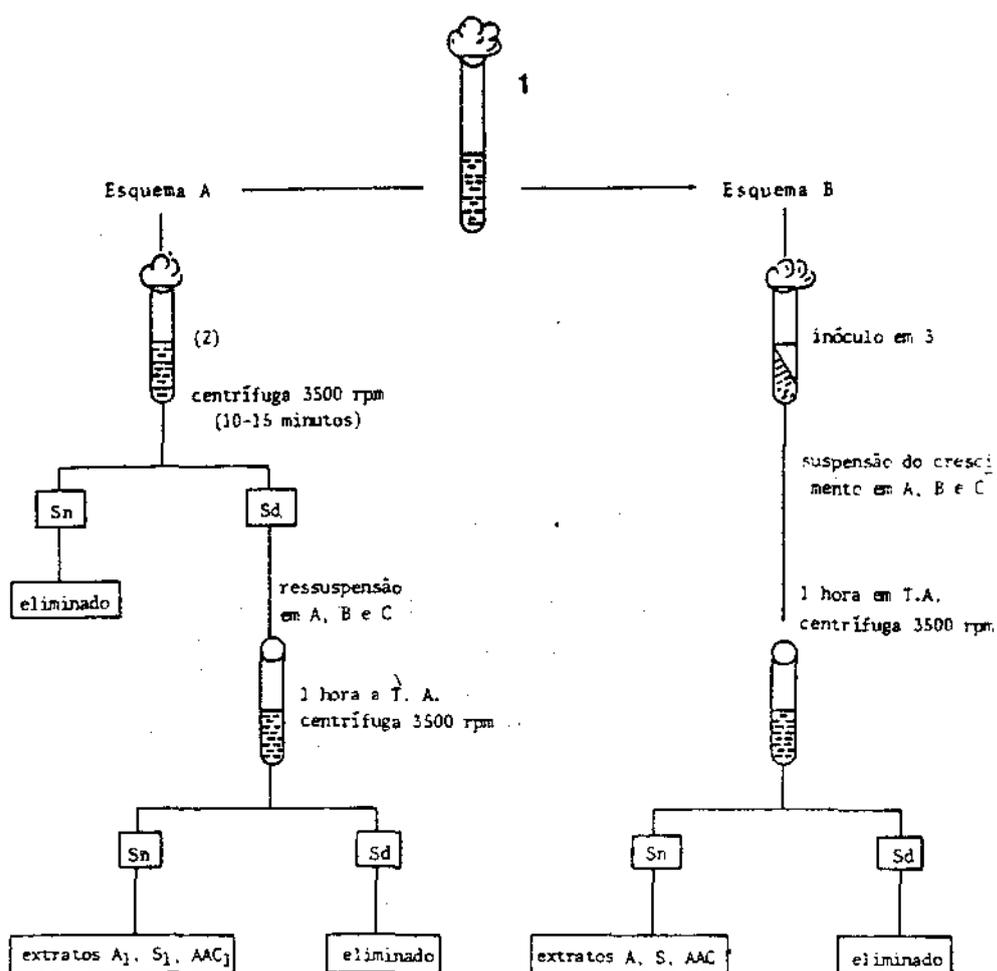
No preparo de antígenos bacterianos para serem utilizados nos testes serológicos em reação com os diversos tipos de antissoros obtidos, utilizou-se os seguintes esquemas:

- a) suspensões em água destilada estéril;
- b) suspensões em salina 0.85% estéril; e
- c) ácido acético a 1%.

Tubos de ensaio com rosca contendo meio de agar-sangue foram semeados com as amostras de estreptococos e incubadas a 37°C por 24-72 horas. Em seguida, o material bacteriano crescido nos tubos foi diluído em salina, água ou ácido acético e transferido para um tubo de ensaio estéril, o qual permaneceu durante 1 hora em T.A. (Esquema 3). Posteriormente, essas suspensões foram centrifugadas a 5.000 rpm (centrífuga Alpha-soro IA) durante 15 minutos e o sobrenadante utilizado como antígenos nos testes serológicos (Extratos A. S. AAC).

Procedimento semelhante foi efetuado a partir do crescimento em tubos de ensaio contendo meio de Tioglicolato (Extratos A₁. S₁. AAC₁).

ESQUEMA 3 - Sequências utilizadas para o preparo de extratos de suspensões bacterianas para serem utilizados nas reações serológicas.



1 - crescimento bacteriano de material liofilizado; 2- suspensão bacteriana (meio de Tioglicolato); 3 - meio de ágar sangue; A - água destilada estéril; S - salina 0.85% estéril; AAC - ácido acético a 1%.

Antígenos foram também preparados de acordo com LANCEFIELD (1933) e RANTZ & RANDALL (1955) para serem usados nas reações serológicas.

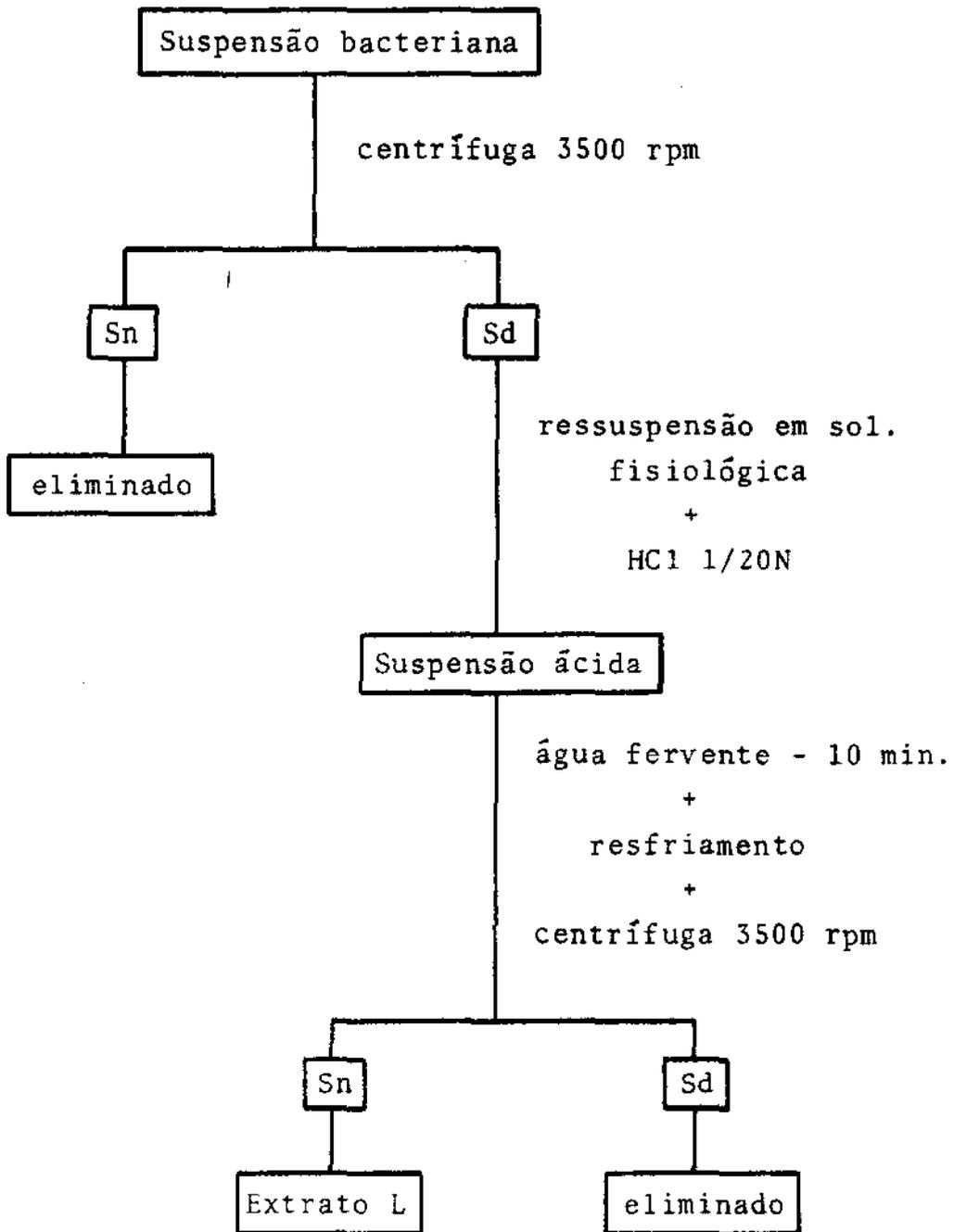
Segundo LANCEFIELD, suspensões bacterianas crescidas em meio de cultura por 24 horas, foram suspensas em 5 cc de solução fisiológica adicionado de HCl 1/20N e testada com papel vermelho de Congo. Posteriormente o tubo de ensaio foi imerso em água fervente por 10 minutos, esfriada sob água corrente e centrifugado. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado como antígeno nas reações - Extrato L - (Esquema 4).

Antígenos preparados segundo RANTZ & RANDALL, foram obtidos inoculando-se o material por 18-24 horas em meio líquido, composto de 20 grs de Tryptose (Difco), 2 grs de dextrose, 5 grs de cloreto de sódio e 2,5 grs de Na_2HPO_4 p/1 de água destilada. Posteriormente ao crescimento, quantidades de 40 ml foram colocadas em tubos de centrífuga e autoclavadas. Após centrifugação eliminou-se o sobrenadante e ao sedimento adicionou-se 0,5 ml de cloreto de sódio 0,9%. O sedimento foi então suspenso com leve agitação. Após esse procedimento, os tubos foram autoclavados por 20 minutos a 1 atmosfera. Em seguida, centrifugou-se a suspensão resultante, eliminando-se o sedimento, sendo o sobrenadante utilizado como antígeno (Esquema 5).

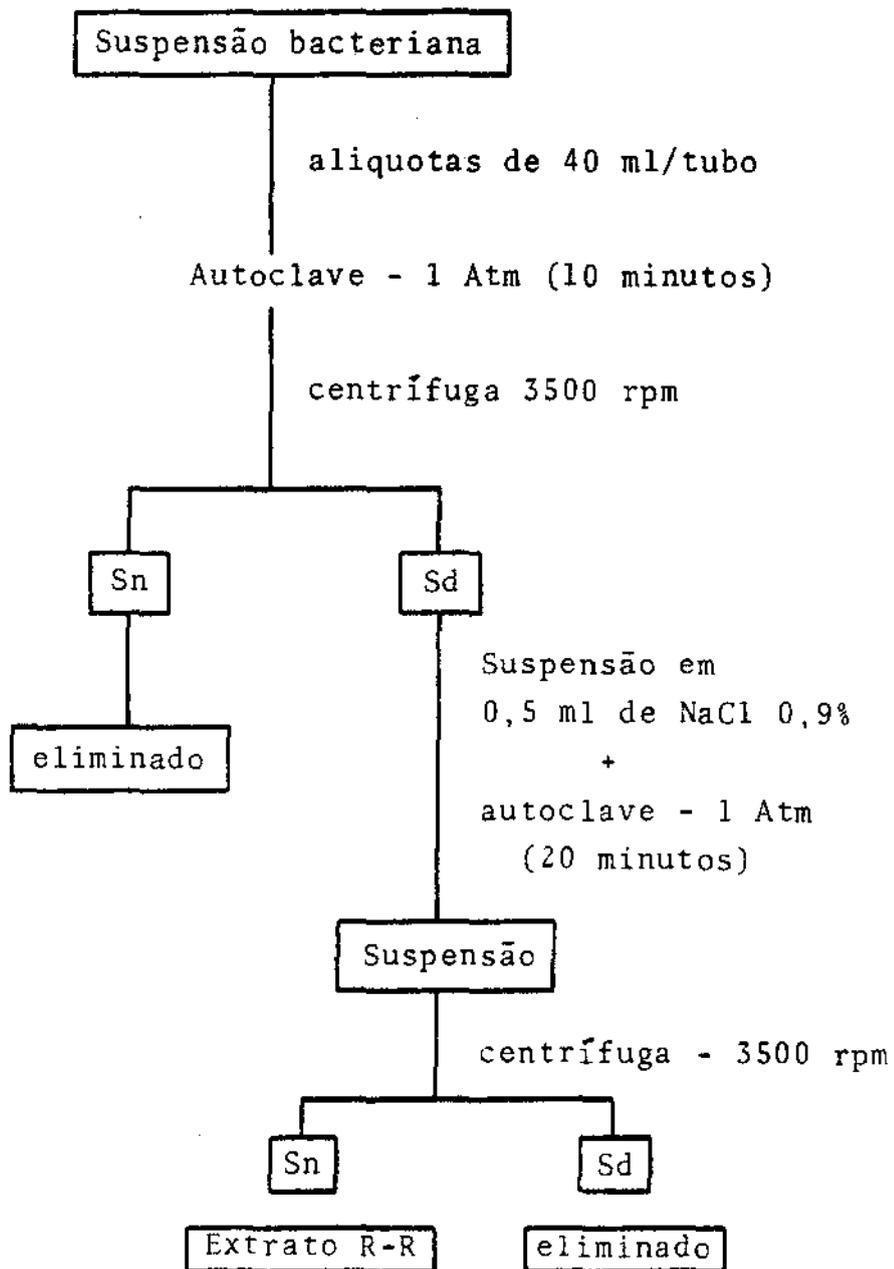
2.7. Testes serológicos

Testes serológicos denominados Teste do anel (Ring test), foram realizados afim de se verificar a reati-

ESQUEMA 4 - Preparo de extratos bacterianos para serem utilizados nas reações serológicas, segundo LANCEFIELD.



ESQUEMA 5 - Preparo de extratos bacterianos para serem usados nas reações serológicas, segundo RANTZ & RANDALL.



vidade do soro dos animais inoculados (a cada sangria), em reação com os antígenos de suspensões bacterianas.

2.7.1. Dupla difusão em gel de agar

Testes serológicos de dupla difusão em gel de agar a 1% foram realizados com os antissoros AS.Ss. ATCC 162; AS.Ss.ATCC 167 e AS.Ss.ATCC 168 em reação com os antígenos de suspensões bacterianas preparados de acordo com o item 2.6. Os testes foram feitos em gel de agar a 1% (OUCHTERLONY, 1949, 1958 e 1962) em tampão PBS 0,01M pH 7,0, tampão veronal 0,025M pH 8,6 e em agar água (HÖFLING, 1975), onde testes de tempos de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) foram analisados.

Foram efetuadas as reações serológicas com cada antígeno individualmente e depois em conjunto, sendo ambos os procedimentos realizados com as sangrias obtidas para cada antissoro em particular.

2.7.2. Determinação do título dos antissoros

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

RESULTADOS

RESULTADOS

1. TÍTULO DOS ANTISSOROS

Os testes serológicos de dupla difusão (ouchterlony) em combinações homólogas, utilizados para a determinação do título de antissoros obtidos pela injeção de suspensões bacterianas padronizadas de *S. sanguis*, permitiram verificar diferenças no título de anticorpos, tal como ilustra o quadro 3. Os títulos máximos obtidos para AS.Ss.ATCC. 162 revelaram valores de 4 na injeção com antígenos obtidos segundo o item 2.3. Os resultados obtidos nos testes com os antissoros AS.SS.ATCC 167 e 168, através da inoculação com os antígenos de suspensões bacterianas padronizadas segundo BRATHALL, mostraram valores de 16 e 8, respectivamente, quando comparados. O soro normal (SN) usado como controle, não apresentou reação.

2. TESTES SEROLÓGICOS

Serão analisados os resultados obtidos em rea-

QUADRO 3 - Título máximo dos antissoros obtidos nas imunizações.

Coelho nº	Antígeno	Código do Antissoro	Título* dos antissoros nos testes de dupla difusão	SN
162	<i>S. mutans</i>	AS.Ss.ATCC 162	4	-
167	<i>S. mutans</i>	AS.Ss.ATCC 167	16	-
168	<i>S. mutans</i>	AS.Ss.ATCC 168	8	-

* Título do antissoro representado pelo inverso da diluição.

SN soro normal

- não apresentou reação

ções serológicas de dupla difusão com os AS.Ss.ATCC 162 , AS.Ss.ATCC 167 e AS.Ss.ATCC 168, em reação com antígenos (extrator de suspensões bacterianas) obtidos por tratamentos diversos, de *S. sanguis*, *S. faecalis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. mutans*.

A análise das linhas de precipitação (LP) observadas, foram feitas em função dos sistemas imunoprecipitantes detectados (Esquema 6).

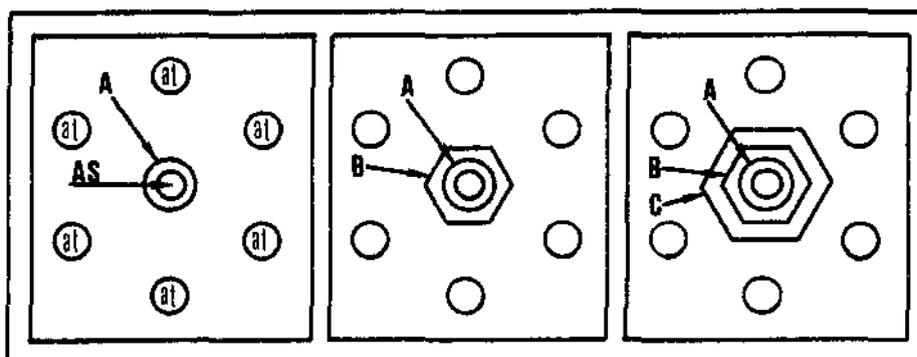
2.1. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 162

Streptococcus sanguis

As reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em a) água destilada estéril, b) salina 0,85% estéril, c) ácido acético a 1%, d) segundo LANCEFIELD e e) segundo Rantz Randall de *S. sanguis*, respectivamente, A, S, AAC, L e R-R, não demonstraram reação positiva em nenhuma das reações efetuadas, observando-se reação inespecífica nos testes efetuados com antígenos de suspensões bacterianas em ácido acético - AAC, as quais foram detectadas em todos os testes efetuados com esse antissoro. Os resultados obtidos nas reações com o antígeno L (segundo LANCEFIELD) não demonstraram reação positiva com nenhuma das sangrias obtidas. Esse mesmo comportamento foi observado em todos os demais testes efetuados com esse antissoro (Quadro 4).

As reações serológicas efetuadas em ágar a 1% em tampão veronal, se apresentaram fracamente positivas, revelando o aparecimento de uma linha de precipitação (LP) nas reações com os antígenos de suspensões bacterianas A e S. Pode-se verificar que para o antígeno A, as reações foram positivas a partir da 9ª sangria obtida, o que demonstra rea-

ESQUEMA 6 - Fotografia e gráfico dos tipos de linha de precipitação (LP) observadas nas reações serológicas de dupla difusão em ágar, entre antissoros e antígenos de suspensões bacterianas (homólogos e heterólogos)



AS - antissoro

at - antígeno

A.B.C - Linhas de precipitação

ção positiva seis dias após a 2^a injeção de antígenos. Nas reações com o antígeno S, observou-se também reação positiva, após a 8^a sangria, 4 dias após a 2^a injeção de antígenos, não se verificando reação positiva com relação a última sangria obtida. Para as demais reações, efetuadas com os antígenos L e R-R, as reações foram negativas. (Quadro 5).

Os testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS, com os antígenos de suspensões bacterianas obtidos, revelaram o aparecimento de reação fracamente positiva para o antígeno A, na 10^a, 11^a e 12^a sangrias, verificando-se o mesmo comportamento com relação ao antígeno S. Nesses testes efetuados, pode-se verificar também reação fracamente positiva com relação ao antígeno R-R, na 8^a, 9^a, 10^a, 11^a e 12^a sangrias obtidas, respectivamente 4, 6, 8, 10 e 12 dias após a 2^a injeção de antígenos. (Quadro 6).

2.2. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 167

Streptococcus sanguis

Nas reações com *S. sanguis* em ágar água a 1% , pode-se verificar reações positivas com os antígenos de suspensões bacterianas A e R-R, observando-se também reações fracamente positivas com o antígeno S. Não se detectou reação positiva com relação ao antígeno L (segundo LANCEFIELD), observando se reação tipo inespecífica com relação ao antígeno AAC, o mesmo verificando-se para os demais testes efetuados com esse antissoro. (Quadro 7).

Os resultados dos testes em ágar a 1% em tampão veronal, demonstraram o aparecimento de reações positivas com os antígenos A e R-R, verificando-se reações negativas para os antígenos S e L, quando comparados (Quadro 8) .

Nos testes em ágar a 1% em tampão PBS, constatou-se reação positiva apenas para o antígeno R-R, não detectando-se reações positivas para os demais antígenos, quando comparados. (Quadro 9).

2.3. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 168

Streptococcus sanguis

As observações decorrentes da análise das reações com *S. sanguis* revelaram o aparecimento de reações positivas somente com relação ao antígeno R-R, não se verificando nenhuma reação com os demais antígenos obtidos, respectivamente, A, S e L. Reações inespecíficas foram observadas com relação ao antígeno AAC, verificando-se o mesmo comportamento para as demais reações feitas com esse antissoro (Quadro 7).

Os resultados obtidos nos testes efetuados em ágar a 1% em tampão veronal, mostraram o aparecimento de reações positivas, somente com relação ao antígeno R-R, o mesmo não se verificando com relação aos demais antígenos, os quais não apresentaram reação, quando comparados (Quadro 8).

Os resultados obtidos nos testes feitos em ágar a 1% em tampão PBS, revelaram reações fracamente positivas somente para o antígeno R-R. Nas demais reações com os antígenos A, S e L, não se verificou reação positiva (Quadro 9).

2.4. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 162

Streptococcus sanguis

As reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de *S. sanguis* em água destilada estéril, em que variações de tempos de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) foram testados (Quadro 10), revelaram reações fracamente positivas (nona sangria), e reações positivas (décima e décima primeira sangria) a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antígeno, após a colocação do antissoro. Na décima segunda sangria, as reações foram fracamente positivas e positivas, respectivamente a 0, 1, 4 e 2,3 horas de colocação do antígeno. Não se observaram reações positivas nas demais reações com as sangrias restantes.

Nos testes com antígenos de *S. sanguis* em água destilada estéril, em que inverteu-se o sistema, houve o aparecimento de reações positivas e fracamente positivas, respectivamente a 1 hora e 0, 2, 3, 4 horas de colocação do antissoro, após a colocação do antígeno para a décima primeira sangria (Quadro 11).

Os testes efetuados com antígenos de *S. sanguis* em salina estéril, demonstraram reações fracamente positivas e positivas, respectivamente, para a nona, décima e décima primeira sangrias. Na décima segunda sangria as reações foram positivas a 1,2 e 3 horas de colocação do antígeno após a colocação do antissoro, e fracamente positivas os testes a 0 e 4 horas de reação (Quadro 12). Os testes em que manteve-se o antígeno a 0 horas e testou-se tempos de colocação do antissoro, observou-se reações fracamente positivas e positiva, respectivamente a 1 hora e 0 horas de reação. Não foram observadas reações positivas nos demais tempos de colocação dos reagentes (Quadro 13).

2.5. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 167

Streptococcus sanguis

Os resultados obtidos nas reações de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril, demonstraram reações positivas a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antígeno, após a colocação do antissoro. Os testes em que inverteu-se o sistema, demonstraram também reação positiva a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antissoro (Quadros 14 e 15).

As reações serológicas com antígenos de suspensões bacterianas segundo RANTZ & RANDALL (R-R), revelaram reações positivas e fracamente positiva, respectivamente, a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antígeno, após a colocação do antissoro. Os testes onde inverteu-se o sistema de reação, revelaram reações positivas a 0, 1, 2 e 3 horas de colocação do antissoro, e após 4 horas as reações foram fracamente positivas (Quadros 16 e 17).

Os testes feitos em ágar a 1% em tampão PBS, com antígenos de suspensões bacterianas R-R, demonstraram reações positivas a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antígeno, após a colocação do antissoro. Essas reações foram fracamente positivas e positiva, respectivamente, a 1, 2, 3, 4 e 0 horas, quando testou-se tempos de colocação do antissoro em relação ao antígeno colocado a 0 horas (Quadros 18 e 19).

2.6. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 168

Streptococcus sanguis

Os testes com esse antissoro em reação com antígenos R-R em ágar-água a 1%, demonstraram reações positivas a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de colocação do antígeno em rela

ção ao antissoro. Nos testes onde inverteu-se o sistema, o mesmo quadro serológico foi observado (Quadros 20 e 21).

Os resultados obtidos nas reações de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal, com essa espécie, revelaram reações positivas e fracamente positivas, respectivamente, a 0,1 e 2, 3, 4 horas de colocação do antígeno, após a colocação do antissoro. Os resultados obtidos invertendo-se o sistema, demonstraram reações positivas e fracamente positivas, respectivamente, a 0, 1, 2 e 3, 4 horas de reação (Quadros 22 e 23).

3. REAÇÕES HOMÓLOGAS E HETERÓLOGAS

3.1. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 162

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de agar a 1% em tampão PBS empregando-se o antissoro AS.Ss.ATCC 162 em reação com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* revelaram o aparecimento de reações positivas para *S. sanguis* e reações fracamente positivas para as demais espécies testadas (Quadro 24). Pode-se verificar o aparecimento de 2 linhas de precipitação (LP) a LPA e C nas reações com o homólogo *S. sanguis*, o mesmo observando-se com relação aos heterólogos *S. mitis* e *S. salivarius*. As reações com *S. faecalis* e *S. mutans* demonstraram o aparecimento da LP-A (Figura 1).

As reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar água a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em salina revelaram o aparecimento de reações fracamente positivas em todos os testes efetuados com o ho-

mólogo *S. sanguis* e os heterólogos *S. mitis*, *S. faecalis*, *S. salivarius* e *S. mutans*. Pode-se verificar apenas um halo de precipitação fracamente positivo correspondente à LP-A (Figura 2). O mesmo comportamento foi observado com relação as reações efetuadas com antígenos obtidos segundo Rantz & Randall, não observando-se reação positiva com o heterólogo *S. faecalis* (Figura 3).

3.2. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 167

As observações decorrentes da análise das reações em gel de ágar água a 1% com esse antissoro em reação com os antígenos homólogos e heterólogos em água, não revelaram reação positiva em nenhum dos testes efetuados (Quadro 25).

Os resultados obtidos nos testes efetuados em gel ágar água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em salina, mostraram o aparecimento de reações positivas apenas para o antígeno homólogo - *S. sanguis* - não se verificando reações positivas com as demais espécies testadas (Quadro 26). Os testes efetuados com esse mesmo antissoro, em reação com antígenos obtidos segundo Rantz & Randall (R-R) revelaram reação positiva para *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. faecalis*, verificando-se reações fracamente positivas com relação a *S. mitis*. Reações negativas foram observadas para a espécie *S. mutans* (Quadro 27). Observou-se somente uma LP, nas reações positivas e fracamente positivas obtidas, a LP-C (Figura 4).

3.3. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 168

Nas reações serológicas de dupla difusão em gel

de ágar-água a 1% com esse antissoro em reação com antígenos de suspensões bacterianas segundo Rantz & Randall(R-R), pode-se observar reação positiva com o homólogo *S. sanguis* e os heterólogos *S. mitis* e *S. faecalis*, não se verificando reação com *S. salivarius* e *S. mutans* (Quadro 28). Nas reações positivas com *S. sanguis*, *S. mitis* e *S. faecalis* observou-se somente uma LP, a LPC (Figura 5).

3.4. Estudos comparativos dos padrões obtidos por dupla difusão em gel de ágar com os homólogos e heterólogos

Serão analisadas as reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar-água a 1%, através da observação comparativa dos padrões obtidos nos testes com os heterólogos *S. mitis*, *S. faecalis* e *S. salivarius* em relação ao homólogo *S. sanguis*.

3.4.1. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 167

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas obtidos segundo Rantz & Randall(R-R) dos heterólogos em relação ao homólogo *S. sanguis*, demonstraram o aparecimento de reações de identidade total, observando-se a presença de LP coalescentes entre os antígenos de *S. mitis*, *S. faecalis*, *S. salivarius* e *S. sanguis* quando comparados. (Figura 6).

3.4.2. Testes Serológicos empregando-se AS.Ss.ATCC 168

Nas reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com esse antissoro, em reação com antígenos de suspensões bacterianas obtidas segundo Rantz & Randall (R-R) dos heterólogos *S. mitis*, *S. faecalis* e *S. salivarius* em relação ao homólogo *S. sanguis*, revelaram o aparecimento de reações de identidade total ou fusão, detectadas através da presença de LP coalescentes entre os diversos antígenos, quando comparados (Figura 7).

QUADRO 4 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
04/02.1	-	-	?	-	-
07/05.1	-	-	?	-	-
09/07.1	-				
11/09.1	-	-	?	-	-
14/12.1	-	-	?	-	-
16/14.1	-	-	?	-	-
18/16.1	-	-	?	-	-
21/04.2	-	-	?	-	-
23/06.2	-	-	?	-	-
25/08.2	-	-	?	-	-
28/10.2	-	-	?	-	-
30/12.2	-	-	?	-	-
01/14.2	-	-	?	-	-
04/17.2	-	-	?	-	-

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - Extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz & Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecíficas

QUADRO 5 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
04/02.1	-	-	?	-	-
07/05.1	-	-	?	-	-
09/07.1	-	-	?	-	-
11/09.1	-	-	?	-	-
14/12.1	-	-	?	-	-
16/14.1	-	-	?	-	-
18/06.1	-	-	?	-	-
21/04.2	-	+	?	-	-
23/06.2	+	+	?	-	-
25/08.2	+	+	?	-	-
28/10.2	+	+	?	-	-
30/12.2	+	+	?	-	-
01/14.2	+	+	?	-	-
04/17.2	-	-	?	-	-

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz & Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
- número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecíficas

QUADRO 6 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
04/02.1	-	-	?	-	-
07/05.1	-	-	?	-	-
09/07.1	-	-	?	-	-
11/09.1	-	-	?	-	-
14/12.1	-	-	?	-	-
16/14.1	-	-	?	-	-
18/16.1	-	-	?	-	-
21/04.2	-	-	?	-	+
23/06.2	-	-	?	-	+
25/08.2	+	+	?	-	+
28/10.2	+	+	?	-	+
30/12.2	+	+	?	-	+
01/14.2	-	-	?	-	-
04/17.2	-	-	?	-	-

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz e Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecíficas

QUADRO 7 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167-168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data sa sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
AS.Ss.ATCC 167 22/07.12	+	±	?	-	+
AS.Ss.ATCC 168 22/07.07	-	-	?	-	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz & Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecíficas

QUADRO 8 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167-168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
AS.Ss.ATCC 167					
22/07.12	+	-	?	-	+
AS.Ss.ATCC 168					
22/07.07	-	-	?	-	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz & Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
- número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecífica

QUADRO 9 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167-168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações obtidas com os diversos antígenos				
	A	S	AAC	L	R-R
AS.Ss.ATCC 167 22/07.12	-	+	?	-	+
AS.Ss.ATCC 168 22/07.07	-	-	?	-	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- A - extratos solúveis em água destilada estéril
- S - salina 0,85% estéril
- AAC - ácido acético a 1%
- L - extratos ácidos segundo Lancefield
- R-R - extratos em autoclave segundo Rantz & Randall
- Numerador - ordem de sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)
- ? - reações inespecíficas

QUADRO 10 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal, com antígenos de suspensões bacterianas, em água destilada estéril.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs						
04/07.1						
07/05.1						
08/07.1						
11/09.1						
14/12.1						
16/14.1						
18/16.1						
21/04.2		-	-	-	-	-
23/06.2		+	+	+	+	+
25/08.2		+	+	+	+	+
28/10.2		+	+	+	+	+
30/12.2		+	+	+	+	+
01/14.2						
04/17.2						

+ - reações positivas
 - - reações negativas
 AG - Variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 hs., após a colocação do antissoro.
 AS - antissoro colocado a 0 hs.
 Numerador - ordem da sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 11 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal, com antígenos de suspensões bacterianas, em água destilada estéril.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(Ag) 0hs						
28/10.2		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 12 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, em salina estéril.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs						
04/07.1						
07/05.1						
08/07.1						
11/09.1						
14/12.1						
16/14.1						
18/16.1						
21/04.2		-	-	-	-	-
23/06.2		±	±	±	±	±
25/08.2		+	+	+	+	+
28/10.2		+	+	+	+	+
30/12.2		±	-	-	-	±
01/12.2						
04/17.2						

+ - reações positivas
 - - reações negativas
 AG - antissoro colocado a 0 horas
 AS - variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antissoro
 Numerador - ordem de sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígenos (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 13 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal, com antígenos de suspensões bacterianas, em salina estéril.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs						
28/10.2		+	±	-	-	-

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 14 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas solúveis em água destilada estéril.

Ordem e data sa sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs AS.Ss.ATCC 167						
22/07.12		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Númerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 15 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, em água destilada estéril.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs AS.Ss.ATCC 167						
22/07.12		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 16 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs AS.Ss.ATCC 167						
22/07.12		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AS - antissoro colocado a 0 horas
- AG - variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antissoro
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 17 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs						
22/07.12		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 18 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão de PBS, com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs						
22/07.12		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AS - antissoro colocado a 0 horas
- AG - variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antissoro
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 19 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS, com antígenos de suspensões bacterianas segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs						
22/07.12		+	±	±	±	±

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno.
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 20 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs						
22/07.07		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AS - antissoro colocado a 0 horas
- AG - variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antissoro
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 21 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs						
22/07.07		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 22 - *S. sanguis* contra AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AG)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AS) 0hs						
22/07.07		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AS - antissoro colocado a 0 horas
- AG - variações de tempo de colocação do antígeno a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antissoro.
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 23 - Antissoro AS.Ss.ATCC 168 contra *S. sanguis*. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall.

Ordem e data da sangria	Tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro)					
	(AS)	0hs	1h	2hs	3hs	4hs
(AG) 0hs						
22/07.07		+	+	+	+	+

- + - reações positivas
- - reações negativas
- AG - antígeno colocado a 0 horas
- AS - variações de tempo de colocação do antissoro a 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a colocação do antígeno
- Numerador - ordem da sangria obtida
- Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de séries das injeções (2º dígito)

QUADRO 24 - Antissoro AS.Ss.ATCC 162. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril.

Ordem e data da sangria	Resultado das reações homólogas e heterólogas com antígenos				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>
AS.Ss.ATCC 162					
25/08.2	+	-	-	-	-

+ - reações positivas
- - reações negativas
Numerador - ordem de sangria obtida
Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 25 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril.

Ordem e data de sangria	Resultado das reações homólogas e heterólogas com antígenos de				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>

AS.Ss.ATCC 167

22/07.12	-	-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---

+	- reações positivas
-	- reações negativas
Numerador	- ordem de sangria obtida
Denominador	- dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
	número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 26 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas em salina estéril.

Ordem e data de sangria	Resultado das reações homólogas e heterólogas com antígenos de				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>

AS.Ss.ATCC 167

22/07.12	+	-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---

+ - reações positivas
- - reações negativas
Numerador - ordem de sangria obtida
Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 27 - Antissoro AS.Ss.ATCC 167. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz & Randall (R-R).

Ordem e data de sangria	Resultado das reações homólogas e heterólogas com antígenos de				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>

AS.Ss.ATCC 167

22/07.2	+	+	-	+	+
---------	---	---	---	---	---

+ - reações positivas
 - - reações negativas
 Numerador - ordem de sangria obtida
 Denominador - dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
 número de série das injeções (2º dígito)

QUADRO 28 - Antissoro AS.Ss.ATCC 168. Testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz & Randall (R-R).

Ordem e data de sangria	Resultado das reações homólogas e heterólogas com antígenos de				
	<i>S.sanguis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.faecalis</i>

AS.Ss.ATCC 168

22/07.07	+	-	-	+	+
----------	---	---	---	---	---

+	- reações positivas
-	- reações negativas
Numerador	- ordem de sangria obtida
Denominador	- dias após a última injeção de antígeno (1º dígito)
	número de série das injeções (2º dígito)

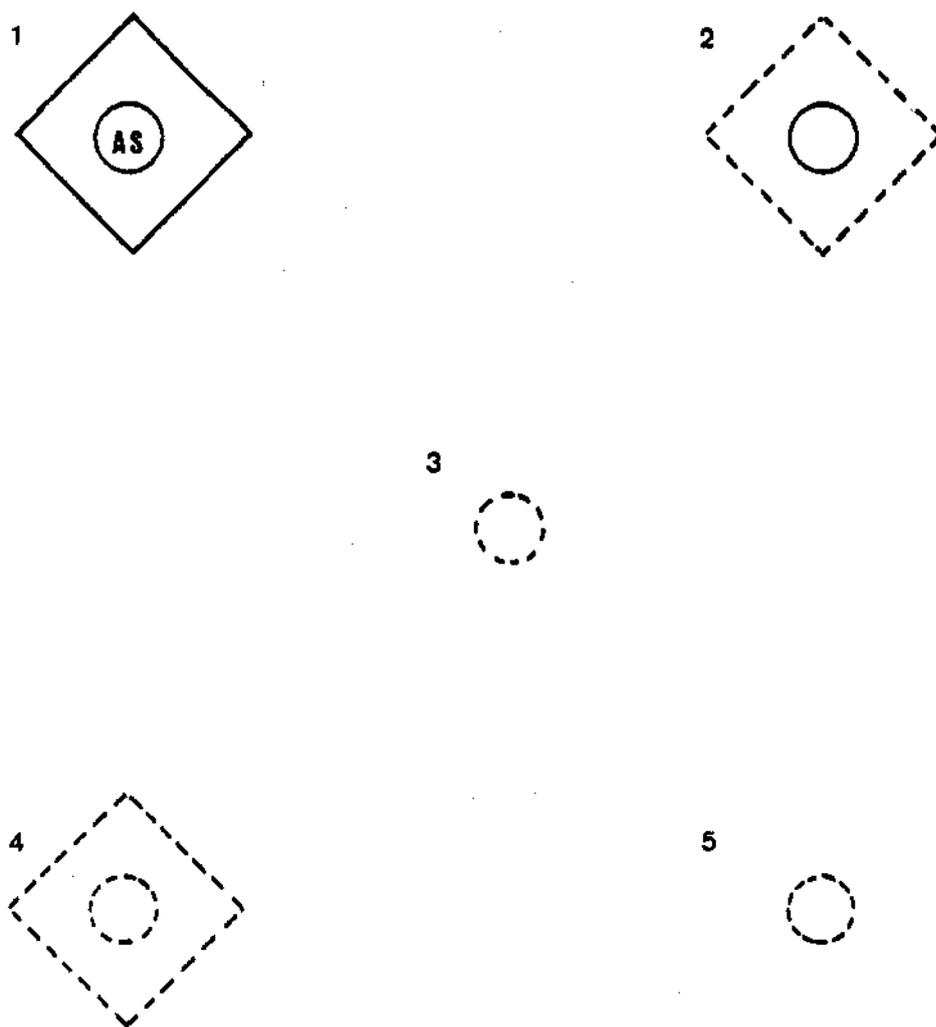


FIGURA 1 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril. (AS): AS.Ss. ATCC 162. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius*, (5) *S. mutans*.

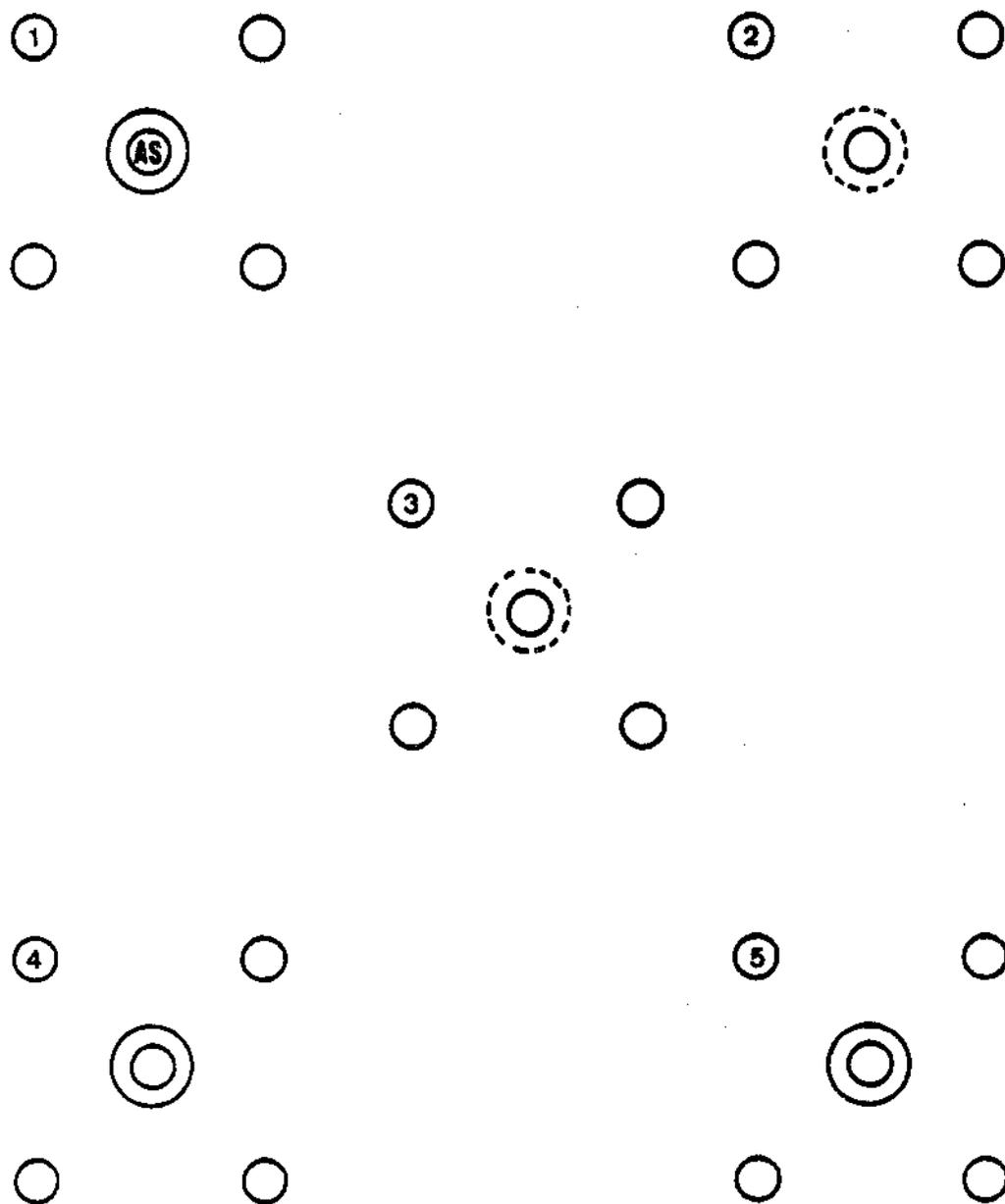


FIGURA 2 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de sispensões bacterianas em salina 0.85%. (AS): AS.Ss.ATCC 162. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius*, (5) *S. mutans*.

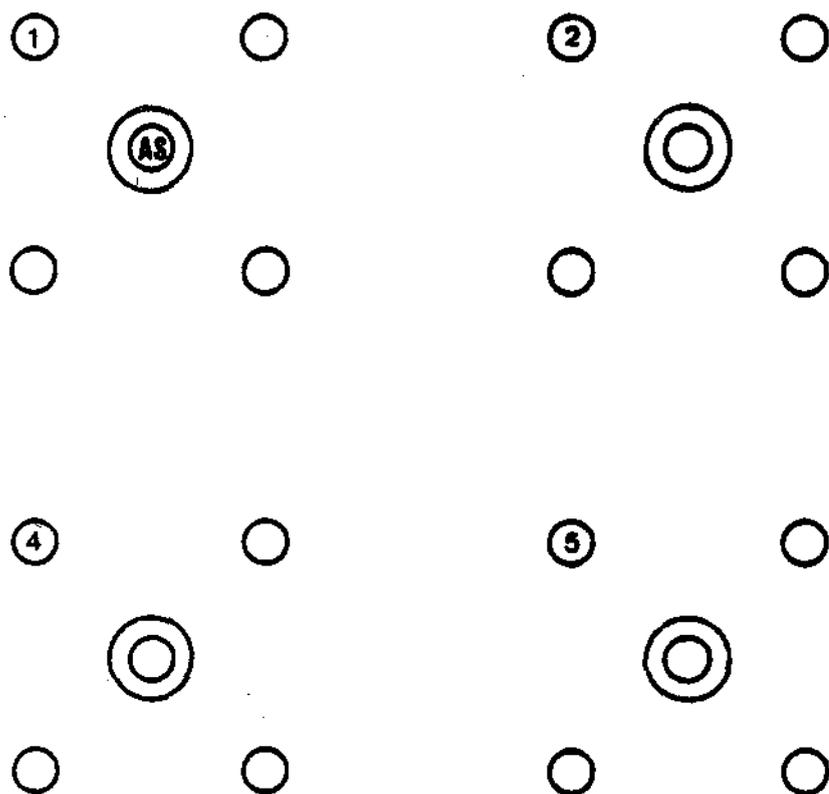


FIGURA 3 - Reação de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (4) *S. salivarius*, (5) *S. mutans*.

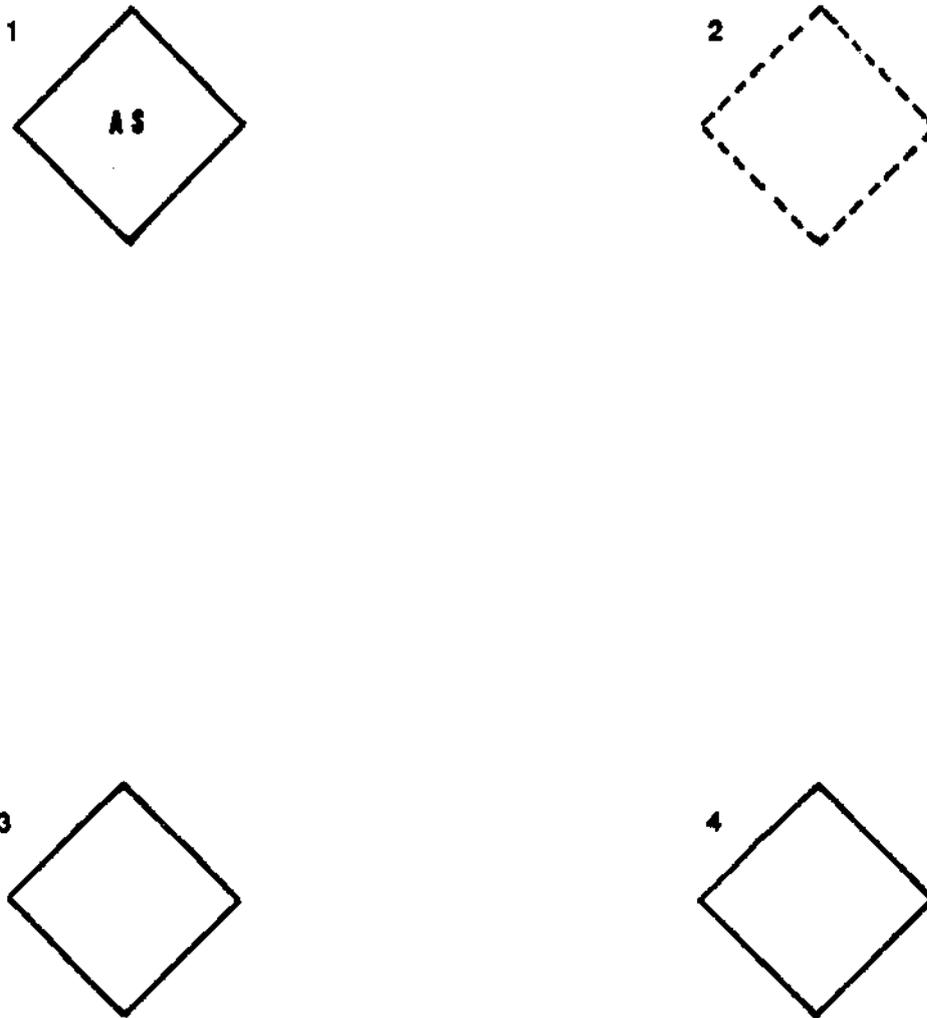


FIGURA 4 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS): AS.Ss.ATCC 167. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius*.

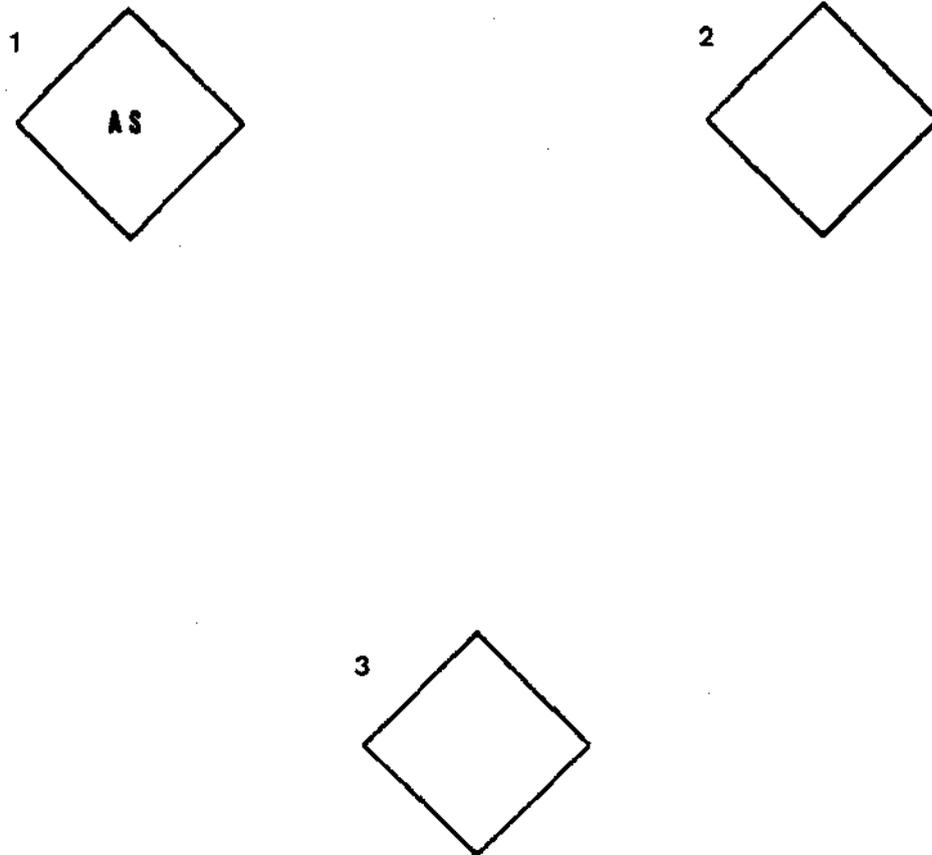


FIGURA 5 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS): AS.Ss.ATCC 168. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*.

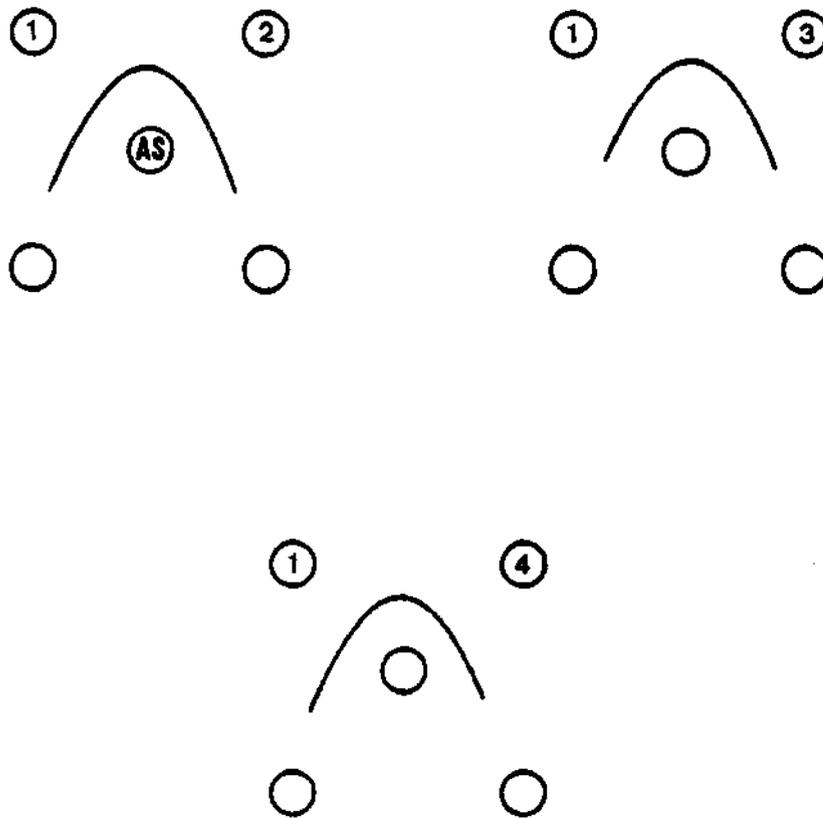


FIGURA 6 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS): AS.Ss.ATCC 167. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius*.

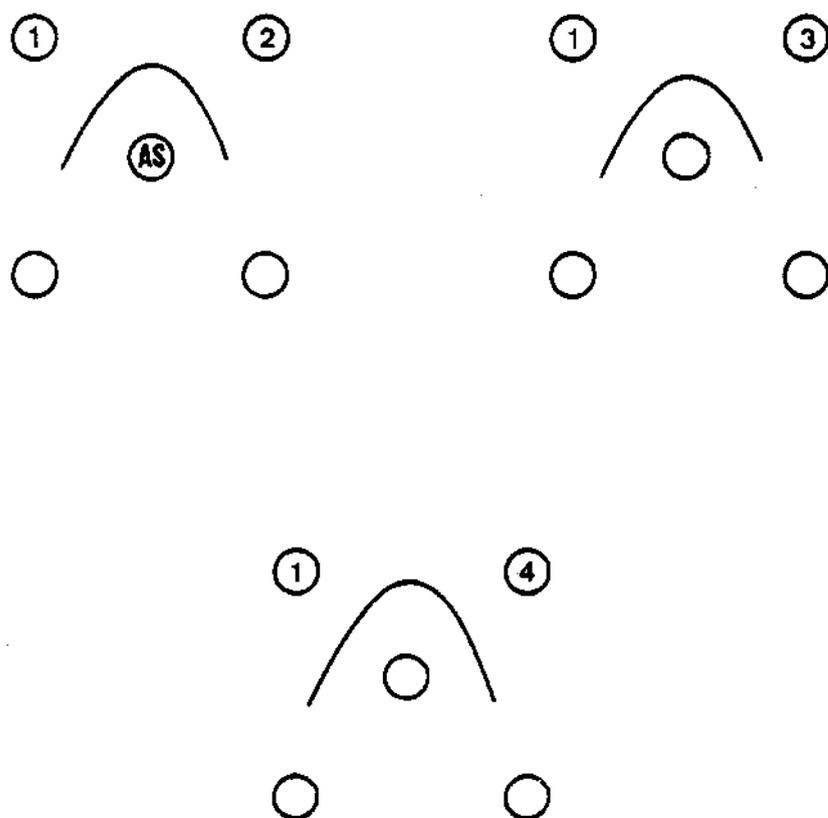


FIGURA 7 - Reação de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz-Randall. (AS): AS.Ss.ATCC 168. Antígenos: (1) *S. sanguis*, (2) *S. mitis*, (3) *S. faecalis*, (4) *S. salivarius*.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A base para a identificação serológica de certos grupos de bactérias é a presença de antígenos específicos. Particularmente, estreptococos possuem antígenos na cápsula e na parede celular como, ácido hialurônico, polissacarídeos tipo-específicos, polissacarídeos grupo-específicos C, ácidos teicóicos, mucopeptídeos, proteínas M e T, etc. Tais substâncias, tem sido de fundamental importância em estudos serológicos. A utilização dessas substâncias como antígenos no preparo de antissoros, tem merecido especial atenção por parte de pesquisadores nessa área. Tais componentes bacterianos, para os quais se pretende preparar antissoros específicos, devem ser submetidos a tratamentos que facilitem os processos de extração do material antigênico e posteriormente a tais tratamentos, esse material é submetido a um tratamento de extração do material antigênico (FULLER, 1938; LANCEFIELD, 1925; RANTZ & RANDALL, 1955; BRATTHALL, 1969). Assim, os estudos efetuados em nossas investigações, teve como objetivo verificar se *S. sanguis* contém antígenos os quais não possam ser detectados nos demais es-

treptococos analisados, em função da metodologia empregada.

Os resultados obtidos nos testes serológicos para determinação do título dos antissoros para *S. mutans*, não apresentaram diferenças significativas quando os títulos máximos obtidos foram analisados. Os antissoros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:4, 1:8 e 1:16 quando determinados pelo teste de Ouchterlony. Tais títulos indicam uma concentração baixa de anticorpos, no entanto, esses resultados confirmaram observações feitas anteriormente por HÖFLING (1975), cujos antissoros utilizados nas reações apresentaram títulos de 1:8, 1:16 e 1:32 quando analisados, sugerindo que antissoros com tais títulos, não foram um fator limitante na obtenção de resultados satisfatórios para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica. Esses antissoros, porém, demonstraram individualmente um comportamento diferente, quando na interpretação das reações serológicas de dupla difusão em reação com os antígenos obtidos por tratamentos diversos.

Os resultados obtidos nas reações serológicas com os antissoros para *S. sanguis*, obtidos através de esquemas de imunizações diferentes, ou seja, injeções feitas diretamente no linfonódulo, intramusculares e intravenosas, respectivamente, AS.Ss.ATCC 162, 167 e 168, demonstraram que as injeções no linfonódulo e intravenosas se mostraram menos adequadas para aplicação em estudos serológicos quando comparadas. Relatos feitos por HÖFLING (1976) com os resultados obtidos nas reações serológicas com os antissoros para *C. arabica* e *C. canephora*, demonstraram que após uma única injeção de antígeno nos coelhos foi possível detectar reações específicas. Tal fato indicou que a injeção no linfonódulo se mostra bastante adequada para aplicação em estudos taxonômicos, como já foi demonstrado por OLIVEIRA (1975). Com relação as injeções intravenosas, também YANO (1976), re

lata a identificação bacteriológica e serológica de algumas amostras de *Xanthomonas campestris* com antissoros obtidos por esse esquema de imunização.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, utilizando-se esquemas de imunizações semelhantes, em princípio não confirmam os resultados obtidos anteriormente por Oliveira e Yano, no entanto, temos que levar em conta que o material utilizado como antígeno foi diferente, indicando que os resultados obtidos no preparo de antissoros, estão - entre os outros - na dependência do tipo de substância utilizada como antígeno no preparo de antissoro, e não propriamente do tipo de imunização, a não ser quando vários esquemas de imunização são utilizados em função do emprego da mesma substância antigênica, podendo, portanto, serem comparados.

A análise dos resultados obtidos nas reações serológicas de dupla difusão com o AS.Ss.ATCC 162, AS. SS. ATCC 167 e AS.Ss.ATCC 168, em reação com antígenos (extratos de suspensões bacterianas) obtidos por tratamentos diversos, de *S. sanguis*, *S. faecalis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. mutans*, em função das linhas de precipitação (LP) observadas, quando as reações foram feitas em gel de ágar-água a 1%, ágar-tampão veronal e ágar tampão PBS, demonstraram que para o AS.Ss.ATCC 162 os resultados foram positivos somente para as reações feitas em tampão veronal e PBS, não se verificando reação positiva com o gel de ágar-água. Quando se comparam os resultados obtidos com o AS.Ss.ATCC 167 e 168, verifica-se que houve reação positiva nos diversos géis de ágar usados, embora em alguns casos as reações sejam fracamente positivas para um determinado antígeno. Essas observações quando associadas com o tipo de antígeno usado nas reações, demonstraram que independentemente do tipo de gel

de ágar empregado, e do antissoros, que não houve reação com os antígenos obtidos segundo Lancefield (L) e em ácido acético (AAC), quando comparados. As reações com o antígeno AAC em reação com o soro normal (SN) foram positivas, indicando que tais reações são inespecíficas. Com relação ao antígeno L, esses resultados parecem confirmar o fato de que, embora na classificação de estreptococos hemolíticos, métodos serológicos tem sido de grande valia quando a técnica de Lancefield é empregada, para o grupo viridantes - dos quais muitos dos estreptococos orais pertencem - esse sistema não é equivalente (cf. BRATHALL, 1972). Esse aspecto, quando associado com a baixa concentração de anticorpos obtidos nos testes serológicos para obtenção de títulos de anticorpos (Quadro 3), parecem sugerir que o problema esteja relacionado com o fato de que muitos dos estreptococos viridantes, não são capazes de induzir a formação de quantidades de anticorpos adequados quando injetados em animais experimentais, ou se o fazem, os anticorpos parecem serem inespecíficos e, portanto, inadequados para a aplicação em estudos de relações de afinidade serológica (LANCEFIELD, 1925; SOLOWAY, 1942 ; SHERMAN et al., 1943; SELBIE et al., 1949; PORTIFIELD, 1950; GUGGENHEIM, 1968).

Os resultados obtidos com o AS.Ss.ATCC 162, no gel de ágar-veronal e PBS foram fracamente positivos em reação com os antígenos A e S, obtendo-se resultados fracamente positivos nas reações com o antígeno R-R, somente em ágar-PBS. Tais resultados, quando comparados com os demais antissoros usados, parecem indicar uma baixa concentração de anticorpos como resultado talvez, não do esquema de imunização utilizado, mas sim do tipo de antígeno usado no preparo de antissoros. Os resultados obtidos com os antissoros 167 e 168, demonstraram serem capazes de reagir com o antígeno R-R nos diversos testes efetuados, e com relação aos

antígenos A e S, ora foi positivo, ora negativo, dependendo do tipo de gel empregado, embora o mesmo comportamento tenha se verificado para os dois antissoros, quando comparados. Tais resultados indicam a necessidade de se conhecer o comportamento dos reagentes (antígeno e antissoro) nos diversos tipos de gel de ágar empregado, antes de se utilizarem definitivamente os dados para aplicação na classificação desses estreptococos. Tais resultados, confirmaram observações feitas anteriormente por HÖFLING (1975, 1976) em estudos serológicos, o qual verificou a necessidade de se padronizar as reações, quando testes semelhantes foram efetuados, embora com materiais diferentes.

Os dados obtidos nas reações serológicas de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão veronal com antígenos de *S. sanguis* em água destilada estéril e salina onde variações de tempo de coleção dos reagentes (antígeno e antissoro) foram testados (Quadros 10, 11, 12 e 13) revelaram o aparecimento de reações positivas, fracamente positivas e ausência de reação, quando manteve-se o antígeno a 0 horas variando-se a colocação do antissoro e depois invertendo-se o sistema, ou seja, mantendo-se o AS a 0 horas e variando-se a colocação do antígeno. O mesmo comportamento foi observado nas reações efetuadas com os demais antissoros, respectivamente AS.Ss.ATCC 167 e 168. Levando-se em conta que essas reações foram feitas com os diversos tipos de entígenos de suspensões bacterianas em reação com todos os antissoros obtidos, esses resultados demonstraram que as variações observadas nos testes serológicos, independem do antígeno e do antissoro empregado. Essas variações confirmam observações feitas por HÖFLING (1975) em estudos serológicos, onde as experiências, em que foram introduzidas modificações nos testes serológicos de dupla difusão e imunoeletroforese, in

dicaram que há um gradiente de concentração envolvido em tais sistemas de reações, sendo que o tipo de tampão, tempo de colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) e distância entre os orifícios, podem constituir fatores limitantes nessas reações. Esses dados e aqueles obtidos em nossas investigações, indicam - através da variabilidade observada nas modificações introduzidas nos testes serológicos - a necessidade de se padronizar as reações. As modificações feitas quanto à colocação dos reagentes (antígeno e antissoro) em tempos pré-determinados sugerem um gradiente de concentração envolvido no sistema e a necessidade de se testarem diluições de ambos os reagentes, para se encontrar o ótimo de reação.

Os dados obtidos nas reações homólogas e heterólogas, através dos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar a 1% em tampão PBS empregando-se o antissoro AS.Ss.ATCC 162 em reação com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* (Quadro 24), demonstraram que o antissoro reage especificamente com o homólogo *S. sanguis*, mas é capaz de reações cruzadas com os demais antígenos heterólogos usados. Tal fato sugere que as substâncias antigênicas extraídas - possivelmente da parede celular - pelo extrator água destilada, possuem determinantes antigênicos que são comuns às várias espécies, quando comparadas, principalmente se associarmos com o baixo título de anticorpos observado para esse antissoro. O número pequeno de reações observadas para o AS.Ss.ATCC 162 nos diversos testes efetuados suportam tais considerações.

Os testes homólogos e heterólogos efetuados com o AS.Ss.ATCC 167 em reação com antígenos de suspensões

bacterianas em água destilada estéril e salina estéril de *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* e *S. faecalis* demonstraram um comportamento diferente, quando comparados (Quadros 25 e 26). Os resultados obtidos nas reações com esse antissoro em reação com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril, não revelaram reação positiva para o homólogo *S. sanguis* e nem para as demais espécies heterólogas testadas. Levando-se em conta que resultados positivos tenham sido observados em testes anteriores com o homólogo *S. sanguis* para esse antissoro em reação com antígenos de suspensões bacterianas em água destilada estéril, leva nos a considerar o fato de que possivelmente a capacidade reativa desse tipo de antígeno - possivelmente polissacarídeos - após um determinado tempo é bastante diminuída, tornando-se incapaz de reagir com o antissoro. Fica, portanto, a necessidade de se fazerem investigações mais acuradas com relação ao tempo de capacidade reativa desse antígeno. Curiosamente, os resultados obtidos com esse mesmo antissoro em reação com antígenos de suspensões bacterianas em salina estéril, revelaram reação positiva para somente o homólogo *S. sanguis*, não demonstrando reação com as demais espécies testadas. Tais resultados, em princípio, parecem sugerir que nesse sistema de reação, o antissoro AS.Ss.ATCC 167 contra o *S. sanguis*, é capaz de reagir especificamente com o homólogo *S. sanguis* sem apresentar reações cruzadas com os demais heterólogos testados, o que nos leva a considerar que esse extrator é capaz de extrair determinantes antigênicos do *S. sanguis*, que não são comuns aos demais antígenos testados, abrindo perspectivas para a aplicação desse sistema de reação em estudos de relações de afinidade serológica entre microrganismos da cavidade oral. Inúmeras investigações levadas a efeito por vários pesquisadores, nos últimos anos (BRATTHALL, 1969, 1972; JABLON & ZINNER, 1966; TOW & SHKLAIR, 1967; PERCH, 1974; HARDIE & BOWDEN, 1974b), tem de-

monstrado a presença de reações cruzadas entre *S. mutans* e outros estreptococos orais, particularmente *S. sanguis* e *S. salivarius* em estudos serológicos. Tais observações, associadas com os dados que obtivemos nos estudos feitos com o AS.Ss.ATCC 167, indicam a necessidade de se obterem antissoros para as demais espécies aqui analisadas, afim de se verificar o comportamento desses antissoros, quando testados individualmente em reações homólogas e heterólogas.

Os resultados obtidos nos testes serológicos de dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas, segundo Rantz & Randall (R-R) em reação com o AS.Ss.ATCC 167, revelaram que esse antissoro é capaz de reação cruzada com os heterólogos *S. salivarius*, *S. faecalis* e *S. mitis*, não se verificando, porém, reação positiva com o heterólogo *S. mutans*. Esses resultados parecem indicar que esse extrator é capaz de extrair antígenos que são comuns entre *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. faecalis* e *S. mitis*, mas não o são com relação a *S. mutans*. O mesmo comportamento foi observado nas reações com o AS.Ss.ATCC 168 (Quadro 27), onde também não se verificou reação positiva com *S. mutans* e *S. salivarius*. Tais observações demonstram uma relativa dificuldade de se interpretar esses dados, já que o tipo de antissoro obtido em função do esquema de imunização utilizado parece influenciar também nos resultados obtidos com esse sistema de reação.

Os resultados obtidos com relação ao AS.Ss.ATCC 167, nos estudos comparativos de padrões proteicos obtidos por dupla difusão em gel de ágar-água a 1% com antígenos de suspensões bacterianas segundo Rantz & Randall dos heterólogos em relação ao homólogo *S. sanguis*, revelaram a presença de LP coalescentes entre os antígenos das espécies *S. mitis*,

S. faecalis, *S. salivarius* e *S. sanguis*, quando comparadas, como pode se verificar na Figura 6. O mesmo comportamento foi observado com relação às reações com o AS.Ss.ATCC 168 (Figura 7). Tais resultados, indicam que para esses sistemas de reação utilizados, as espécies testadas - com exceção de *S. mutans* - apresentaram um grau relativo de afinidade serológica. De modo geral, os resultados obtidos sugerem uma maior proximidade serológica das espécies *S. faecalis*, *S. mitis* e *S. salivarius* (secundariamente) com o *S. sanguis*.

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

Quando os primeiros antissoros polivalentes foram testados contra extratos antigênicos homólogos e heterólogos, muitas linhas de precipitação foram formadas. Tais observações, vem confirmar a idéia de que os antissoros são estimulados por um "mosaico" de antígenos. Tem sido demonstrado, que as reações são parcialmente o resultado de anticorpos contra polissacarídeos extracelulares. Tem sido observado que preparações de polissacarídeos (dextrana) - devido às diferenças no tamanho dos sitios de combinação dos

anticorpos - podem apresentar mais que uma linha de precipitação (SCHLOSSMAN & KABAT, 1962). Essa pode ser a razão por que muitas das linhas de precipitação originais são excluídas, quando antissoros são produzidos de crescimentos celulares em meio de glicose. Outra razão para a multiplicidade de linhas de precipitação pode ser a heterogeneidade do material antigênico usado na imunização (polissacarídeo) GUGGENHEIM & NEWBORN (1969) relatam que uma cepa de estreptococos cariogênico pode conter muitos glicosil-transferases, as quais são responsáveis pela formação de uma mistura de glucanos. Se as diferenças estruturais dessas substâncias incluem determinantes antigênicos da molécula, é possível que mais de uma linha de precipitação ocorra. De qualquer forma, em qualquer caso, parece importante que antissoros devam ser testados em relação a presença de anticorpos contra polissacarídeos extracelulares antes de se iniciarem investigações com o propósito de classificação. Tal recomendação possui também relevância em estudos serológicos com *S. sanguis* e *S. salivarius*. O conteúdo de anticorpos anti-dextrana podem ser testados através de preparações comerciais de dextrana.

Os resultados apresentados neste trabalho, sugerem a necessidade de se obter informações com relação ao preparo de antissoros para as demais espécies aqui analisadas, com o objetivo de se ampliarem as informações sobre o comportamento desses antissoros quando testados individualmente em reações homólogas e heterólogas, assim como também desenvolver metodologias que possam extrair determinantes antigênicos que não apresentem reação cruzada com os heterólogos. É também relevante realizar estudos com outros componentes das células bacterianas - ácidos teicônicos, proteínas M e T, etc. - afim de se preparar antissoros que possam

ser aplicados em estudos de relações de afinidade serológica entre estreptococos da cavidade oral.

O conjunto de dados aqui apresentados, indicam que o emprêgo de técnicas serológicas pode contribuir para o propósito de classificação de estreptococos orais. Os resultados obtidos abrem perspectivas de novas pesquisas através do estudo de um maior número de espécies da cavidade oral, no sentido de ampliar um conhecimento mais preciso entre essas espécies.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

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

1) A injeção de suspensões de células bacterianas de *S. sanguis*, induzem a formação de anticorpos em coelhos. Os antissoros obtidos pela inoculação desses antígenos, reagem com o antígeno homólogo e apresentam reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão em gel de ágar;

2) Pelo menos um dos antissoros, o AS.Ss.ATCC 167 reage especificamente com o homólogo *S. sanguis* sem apresentar reações cruzadas com os antígenos heterólogos usados;

3) Os antissoros AS.Ss.ATCC 162, AS.Ss.ATCC 167 e AS.Ss.ATCC 168 obtidos contra *S. sanguis*, se comportaram diferentemente quando testados em reação com antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. faecalis*:

4) Os testes serológicos com os antíseros obtidos em reação com os antígenos de suspensões bacterianas em água, salina, ácido acético, segundo Lancefield e segundo Rantz & Randall, indicaram que há diferenças qualitativas nas reações em relação às linhas de precipitação obtidas;

5) As reações serológicas efetuadas com os antígenos de suspensões bacterianas em água, salina, segundo Rantz & Randall, em ácido acético e segundo Lancefield, demonstraram que esses dois últimos se mostram muito pouco adequados para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica, enquanto os extratos obtidos segundo Rantz & Randall parecem ser mais adequados;

6) A variabilidade observada nas modificações introduzidas nos testes serológicos para as espécies de estreptococos analisados, demonstraram a necessidade de se padronizar as reações. As modificações feitas quanto à colocação dos reagentes (antígeno e antissor) em tempos pré-determinados sugerem um gradiente de concentração envolvido no sistema e a necessidade de se testarem diluições de ambos os reagentes, para se encontrar o ótimo de reação;

7) De modo geral, os estudos de relações de afinidade serológica efetuados entre as espécies de estreptococos analisados, demonstraram que *S. mutans* não possui identidade com as demais espécies analisadas;

8) Os estudos comparativos dos padrões proteicos obtidos por dupla difusão em gel de ágar a 1% com os antígenos homólogos e heterólogos das espécies de estreptococos testadas - com exceção de *S. mutans* - apresentaram uma identidade total quando comparados;

9) A análise serológica provou ser um método de valor complementar em estudos com o propósito de classificação de estreptococos da cavidade oral.

RESUMO

RESUMO

Com o propósito de se aplicar técnicas serológicas como contribuição na classificação de estreptococos da cavidade oral, antissoros obtidos para *S. sanguis*, foram utilizados nas reações serológicas em reação com antígenos de suspensões bacterianas de algumas espécies de estreptococos orais.

Os antissoros obtidos contra essa espécie, se comportaram diferentemente quando testados em reação com antígenos de suspensões bacterianas de *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. faecalis*.

Os testes efetuados com antígenos de suspensões bacterianas em água, salina, segundo Rantz e Randall, em ácido acético e segundo Lancefield, demonstraram que esses dois últimos se mostram pouco adequados para aplicação em estudos de relações de afinidade serológica, enquanto os extratos obtidos segundo Rantz & Randall parecem ser mais adequados.

Estudos serológicos comparativos feitos com antissoros para *S. sanguis* - obtidos através de esquemas de imunizações diferentes - em reação com os antígenos de suspensões bacterianas, indicaram que os antissoros obtidos reagem com o antígeno homólogo e apresentam reação cruzada com os antígenos heterólogos usados nos testes de dupla difusão em gel de ágar. Pelo menos um dos antissoros reage especificamente com o homólogo *S. sanguis* sem apresentar reações cruzadas com as demais espécies.

As reações serológicas efetuadas entre homólogos e heterólogos com os reagentes (antígeno e antissoro) em que se observaram reações cruzadas - quando estudos comparativos foram feitos com relação aos padrões proteicos obtidos por dupla difusão em gel de ágar a 1% - demonstraram que as espécies testadas - com exceção de *S. mutans* - apresentaram uma identidade total quando comparadas. De modo geral, a análise serológica provou ser um método de valor complementar em estudos com o propósito de classificação de estreptococos da cavidade oral.

SUMMARY

SUMMARY

In an attempt to apply serological techniques to the classification of oral microorganisms an antisera obtained from *S. sanguis* were utilized in order to classify serologically five streptococcus strains from the oral cavity.

The antisera raised against *S. sanguis* had different properties when tested against antigens of *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. mutans* and *S. faecalis*.

In the tests we used bacterial antigens extracted in water, saline, acetic acid. The techniques of Rantz & Randall (1955) and Lancefield (1933) also have been used. The Lancefield techniques and extracts in acetic acid were less adequate in comparison to the others for serological classification. The most useful technique to prepare the antigens was that described by Rantz & Randall.

The antisera prepared from *S. sanguis* showed positive serological reactions with the homologous antigen

and cross reacted with all heterologous species tested, but *S. mutans*.

As the antisera were prepared by different methods it was observed that just one reacted only with the homologous *S. sanguis* antigen and it was negative against all heterologous antigens used.

These results demonstrated serological affinities among *S. faecalis*, *S. mitis*, *S. salivarius* and *S. sanguis* but not with *S. mutans*. This observations seemed to be very significant in the classification of oral streptococcus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, G.F. & SCOTT, W.M. 1928. A case of infective endocardities due to *Streptococcus mutans*. Lancet, 2: 697-699.
- BERG, J.D. & NORD, C.E. 1973. A method of isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. Scandinavian Journal of Dental Research, 81: 163-166.
- BERKOWITZ, R.J. & JORDAN, H.V. 1975. Similarity of bacteriocins of *Streptococcus mutans* from mother and infant. Archives of Oral Biology, 20: 725-730.
- BIER, O. 1973. Bacteriologia e imunologia, em suas implicações à medicina e à higiene. 16 ed. rev. e ampl. Ed. da Univ. São Paulo.
- BILL, N.J. & WASHINGTON, J.A. 1975. Bacterial interference by *Streptococcus salivarius*. American Journal of clinical Pathology, 64: 116-120.

BOWDEN, G.H.; HARDIE, J.M. & SLACK, G.L. 1975. Microbial variations in approximal dental plaque. *Caries Research*, 9: 253-277.

_____ ; _____ ; MCKEE, A.S.; MARSH, P.D.; FILLERY, E.D. & SLACK, G.L. 1976. The microflora associated with developing carious lesions of the distal surfaces on the upper first premolars in 13-14 year old children. *Proceeding - Microbial Aspects of Dental Caries*, eds. STILES, H.M., LOESCHE, W.J. & O'BRIEN, T.C. Special Supplement to *Microbiology Abstracts*, 1: 223-241.

BOWEN, W.H. 1969. A vaccine against dental caries. *British Dental Journal*, 126: 159-160.

_____ ; COHEN, B.; COLE, M.F. & COLMAN, G. 1975. Immunization against dental caries. *British Dental Journal*, 139 : 45-58.

_____ ; GENCO, R.J. & O'BRIEN, T.C. 1976. (eds) *Immunologic Aspects of Dental Caries*. Special Supplement to *Immunology Abstracts*, Washington. Washington, D.C. & London : Information Retrieval Inc.

BRATTHALL, D. 1969. Immunodiffusion studies on the serological specific of streptococcus resembling *S. mutans*. Reprinted from *Odontologisk Revy.*, 20(3): 231-243.

_____ . 1970. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *Streptococcus mutans*. *Odontologisk Revy*, 21: 143-152.

_____ . 1972. Immunofluorescent identification of *Streptococcus mutans*. *Odontologisk Revy*, 23: 181-196.

- CALDWELL, J.; CHALLACOMBE, S.J. & LEHNER, T. 1977. A sequential bacteriologic and serological investigation of Rhesus monkeys immunised against dental caries with *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Microbiology*, 10: 213-224.
- CARLSSON, J. 1965. Zooqllea-forming streptococci, resembling *Streptococcus sanguis*, isolated from dental plaque in man. *Odontologisk Revy*, 16: 348-358.
- _____. 1967. Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the cavity in man. *Odontologisk Revy*, 18: 55-74.
- _____. 1968. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. *Odontologisk Revy*, 19: 137-160.
- _____. 1970a. Chemically defined medium for growth of *Streptococcus sanguis*. *Caries Research*, 4: 297-304.
- _____. 1970b. Nutricional requirements for *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 4: 305-320.
- _____. 1971a. Nutricional requirements of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 67: 69-76.
- _____. 1971b. Growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in mixed culture. *Archives of Oral Biology*, 16: 963-965.
- _____. 1972. Nutricional requirements of *Streptococcus sanguis*. *Archives of Oral Biology*, 17: 1327-1332.
- _____: GRAHNEN, H. & JONSSON, G. 1975. Lactobacilli and Streptococci in the month of children. *Caries Research*, 9: 333-339.

CARLSSON, J.; GRAHNEN, H.; JONSSON, G. & WIKNER, S. 1970a. Early establishment of *Streptococcus salivarius* in the mouth of infants. *Journal of Dental Research*, 49: 415-418.

_____; _____; _____ & _____. 1970b. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouth of infants. *Archives of oral Biology*, 15: 1143-1148.

CHIU, T.H.; EMDUR, L.I. & PLATT, D. 1974. Hipoteichoic acids from *Streptococcus sanguis*. *Infection and Immunity*, 118: 471-479.

CHORPENNING, F.W.; COOPER, H.R. & ROSEN, S. 1975. Cross-reactions of *Streptococcus mutans* due to cell wall teichoic acid. *Infection and Immunity*, 12: 586-591.

CLARKE, J.K. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 5: 141-147.

COLMAN, G. 1968. The application of computers to the classification of streptococci. *Journal of General Microbiology*, 50: 149-158.

_____. 1969. Transformation of viridans like streptococci. *Journal of General Microbiology*, 57: 247-255.

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

_____. 1976. The viridans streptococci. In selected topics in clinical bacteriology, ed. De Louvoux, J. London; Baillièrre Tindal.

COLMAN, G. & WILLIAMS, R.E.O. 1965. The cell walls of streptococci. *Journal of General Microbiology*, 41: 375-387.

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

_____ & _____. 1972. Taxonomy of some human viridans streptococci. In *Streptococci and Streptococcal Disease*, eds Wannamaker, L. & Matsen, J.M. London & New York: Academic Press.

_____ ; BOWEN, W.H. & COLE, M.F. 1977. The effects of sucrose, fructose, and a mixture of glucose and fructose on the incidence of dental caries in monkeys (*M. fascicularis*). *British Dental Journal*, 142: 217-221.

COWAN, S.T. 1974. *Cowan and Steels Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge: Cambridge University Press.

COYKENDALL, A.L. 1974. Four types of *Streptococcus mutans* - based on their genetic antigenic and biochemical characteristics. *Journal of General Microbiology*, 83: 327-338.

_____. 1977. Proposed to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status, based on their molecular composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27: 26-30.

CRAWFORD, J.J.; SCONYERS, J.R.; MORIARTY, J.D.; KING, R.C. & WEST, J.F. 1974. Bacteriemia after tooth extractions studied with the aid of prereduced anaerobically sterilized culture media. *Applied Microbiology*, 27: 927-933.

- CROUSAZ, PH. DE & GUGGNHEIM, B. 1966. Immunochemical studies on cariogenic streptococci. *Helvetica Acta Odontologica*, 10: 38-40.
- CULLEN, G.A. 1967. Classification of *Streptococcus uberis* - with biochemical tests. *Research in Veterinary Science*, 8: 83-88.
- DAJANI, A.S.; TOM, M.C. & LAW, D.J. 1976a. Viridans, bacteriocins of alpha-haemolytic streptococci: isolation, characterization and partial purification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9: 81-88.
- _____ ; LAW, D.J.; BOLLINGER, R.O. & ECKLUND, P.S. 1976b. Ultrastructural and biochemical alterations effected by viridin B, a bacteriocin of alpha-haemolytic streptococci. *Infection and Immunity*, 14: 776-782.
- DE COSTA, T. & GIBBONS, R.J. 1968. Hydrolysis of levan by human plaque streptococci. *Archives of Oral Biology*, 13: 609-617.
- DELISLE, A.L. 1976. Activity of two *Streptococcus mutans* bacteriocins in the presence of saliva, levan and dextran. *Infection and Immunity*, 13: 619-626.
- DE STOPPELAAR, J.D. 1971. The occurrence of *Streptococcus mutans* in dental plaque: an epidemiological survey with special reference to caries activity. In *Tooth Enamel* - vol. 2, eds Fearnhead, R. & Stack, M.V. Bristol: Wright.
- DIERNHOFER, K. 1930. *Arch. Wissnsch, u prokt. Tienheilk*, 61: 181-296.

- DODD, R. 1949. Serologic relationship between streptococcus group H and *Streptococcus sanguis*. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, 70: 598-599.
- DONOCHUE, H.D. & TYLER, J.E. 1975. Antagonisms amongst streptococci isolated from the human oral cavity. Archives of Oral Biology, 20: 381-387.
- DRUCKER, D.B. & MELVILLE, T.H. 1971. The classification of some oral streptococci of human or rat origin. Archives of Oral Biology, 16: 845-853.
- _____ & VEAZEY, F.J. 1977. Fatty acid fingerprints of *Streptococcus mutans* NCTC 10832 grown at various temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 33: 221 - 226.
- _____ ; GRIFFITH, C.J. & MELVILLE, T.H. 1976. Fatty acid fingerprints of some chemostat-grown streptococci with computerized data analysis. Microbios Letter, 1: 31-34.
- DURACK, D.T. 1975a. Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions. Journal of Pathology, 115 81-89.
- _____ & BEESON, P.B. 1972a. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. British Journal of Experimental Pathology, 53: 44-49.
- _____ & _____. 1972b. Experimental bacterial endocarditis. II. Survival of bacteria in endocardial vegetations. British Journal of Experimental Pathology, 53: 50-53.

DURACK, D.T. & PETERSDORF, R.G. 1973. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. I. Comparison of commonly recommended prophylactic regimens. *The Journal of Clinical Investigation*, 52: 592-598.

_____ ; PELLETIER, L.L.Jr. & PETERSDORF, R.G. 1974. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. II. Synergism between penicillin and streptomycin against penicillin-sensitive streptococci. *The Journal of Clinical Investigation*, 53: 829-833.

EDWARDSSON, S. 1968. Characteristics of caries inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 13: 637-646.

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

_____ ; KOCH, G. & OBRINK, M. 1972. *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius* in saliva. Prevalence and relation to caries increment and prophylactic measures. *Odontologisk Revy*, 23: 279-296.

ELLWOOD, D.C. & HUNTER, J.C. 1976. The mouth as a chemostat. In continuous culture 6. Applications and New Fields, eds Deam, A.C.R.; Ellwood, D.C.; Evans, C.G.T. & Melling, J. - Chichester: Ellis Horwood Limited.

_____ ; LONGYEAR, V.M.C. & HUNTER, J.R. 1972. Growth of mixed cultures of organisms derived from human dental plaque in a chemostat. *Journal of General Microbiology*, 71 (Abstract).

FACKLAM, R.R. 1974. Characteristics of *Streptococcus mutans*

isolated from human dental plaque and blood. International Journal of Systematic Bacteriology, 24: 313-319.

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

FARMER, E.D. 1953. Streptococci of the mouth and their relationship to subacute bacterial endocarditis. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 46: 201-208.

FITZGERALD, R.J. 1968. Dental caries research in gnotobiotic animals. Caries Research, 2: 139-146.

_____ & KEYES, P.H. 1960. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Am. dent. Ass., 61: 9-19.

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

GARRISON, P.K. & FREEDMAN, L.R. 1970. Experimental endocarditis. I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene canule in the right side of the heart. Yale Journal of Biology and Medicine, 42: 394-410.

GIBBONS, R.J. & VAN HOUTE, J. 1975b. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annual Reviews of Microbiology, 29: 19-44.

_____ ; BERMAN, K.S.; KOETTNER, P. and KAPSIMALIS, B. 1966. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats

- infected with capsule forming streptococci of human origin. *Archs. oral Biol.*, 11: 549.
- GIBBONS, R.J.; DE PAOLA, R.P.; SPINELL, D.M. & SKOBE, Z. 1974 . Interdental localization of *Streptococcus mutans* as related to dental caries experience. *Infection and Immunity*, 9: 481-488.
- GLEDHILL, W.E. & CASIDA, L.E. 1969. Predominant catalase negative soil bacteria. 1. Streptococcal population indigenous to soil. *Applied Microbiology*, 17: 208-213.
- GOLD, O.G.; JORDAN, H.V. & VAN HOUTE, J. 1975. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Archives of Oral Biology*, 20: 473-477.
- GOODFELLOW, M.; COLLINS, M.D. & MINNINKIN, D.E. 1976. Thin layer chromatographic analysis of mycolic acid and other long-chain components in whole-organisms methanolysates' of coryneform and related taxa. *Journal of General Microbiology*, 96: 351-358.
- GRENIER, E.M.; EVELAND, W.C. & LOESCHE, W.J. 1973. Identification of *Streptococcus mutans* serotypes in dental plaque by fluorescent antibody techniques. *Archives of Oral Biology*, 18: 707-715.
- GRUBER, M. & DURHAM, H.E. 1896. Eine neue methode zur raschen erkennung des cholera vibrio und des thyphus bacillus. - *Munch. med. Wschr.*, 43: 285.
- GUGGENHEIM, B. 1968. Streptococci of dental plaques. *Caries Res.*, 2: 247.

- GUGGENHEIM, B. and NEWBRUN, E. 1969. Extracellular glycosyl transferase activity of an HS strain of *S. mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 13: 84.
- GUTHOF, O. 1956. Ueber pathogene Vergrunende Streptokokken: Streptokokken-Be funde bei dentogen Abszessen und Infiltraten im Bereich der Mundhohle. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions Krankheiten und Hygiene Abt. I* 166: 553-564.
- HAMADA, S. & OOSHIMA, T. 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (Mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 54: 140-145.
- _____ ; MASUDA, N.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S. & KOTANI, S. 1976. Epidemiological survey of *Streptococcus mutans* among Japanese children. *Japanese Journal of Microbiology*, 20: 33-44.
- HARDER, E. J.; WILKOWSKE, C. J.; WASHINGTON, J. A. II. & GERACI, J. E. 1974. *Streptococcus mutans* endocarditis. *Annals of Internal Medicine*, 80: 364-368.
- HARDIE, J. M. 1975. Studies on *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. Ph.D. Thesis, University of London.
- _____ & BOWDEN, G. H. 1974a. The normal microbial flora of the mouth. In the normal microbial flora of man, eds Skinner, F. A. & J. G. London & New York: Academic Press.
- _____ & _____. 1974b. Cell wall and serological studies on *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 8: 301 - 316.

HARDIE, J.M. & BOWDEN, G.H. 1975. Bacterial flora of dental plaque. *British Medical Bulletin*, 31: 131-136.

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

_____ & _____. 1976b. Some serological cross-reactions between *S. mutans*, *S. sanguis* and other dental plaque streptococci. *Journal of Dental Research*, 55: C50 - C58.

_____ & _____. 1976c. The microbial flora of dental plaque: bacterial succession and isolation considerations. *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries*, eds. Stiles, H.M.; Loesche, W.J. & O'Brien, T.C. *Special Supplement to Microbiology Abstracts*, 1: 63-87.

_____ & MARSH, P.D. 1978. Streptococci and the Human Oral flora. From new book on "Streptococcus". *Academ. Press*, 157-205.

_____ ; THOMSON, P.L.; SOUTH, R.J.; MARSH, P.D.; BOWDEN, G. H.; MCKEE, A.S.; FILLERY, E.D. & SLACK, G.L. 1977. A longitudinal epidemiological study on dental plaque and the development of dental caries-interim results after two years. *Journal of Dental Research*, 56: C90-C99.

HARE, R. 1935. The classification of hemolytic streptococci from the nose and throat of normal human beings by means of precipitin and biochemical tests. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 41: 499-512.

HEHRE, E.J. 1948. Dextran-forming streptococci from the blo

od in subacute endocarditis and from the throats of healthy persons. Bulletin of the New York Academy of Medicine, 24: 543-544.

HOERMAN, K.C.; KEENE, H.J.; SHKLAIR, I.L. & BURMEISTER, J. A. 1972. The association of *Streptococcus mutans* with early carious lesions in human teeth. Journal of the American Dental Association, 85: 1349-1352.

HÖFLING, J.F. 1975. Reações serológicas com antígenos presentes em sementes de *Coffea arabica* L. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 45pp.

_____. 1976. Serologia aplicada ao estudo de algumas espécies do gênero *Coffea* e suas implicações na origem de *C. arabica* L. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 88pp.

HOLMBERG, K. & HALLANDER, H.O. 1972. Interference between Gram-positive microorganisms in dental plaque. Journal of Dental Research, 51: 588-595.

_____ & _____. 1973. Production of bactericidal concentrations of hydrogen peroxide by *Streptococcus sanguis*. Archives of Oral Biology, 18: 423-434.

HOOK, E.W. III; ROBERTS, R.B. & SANDE, M. 1975. Antimicrobial therapy of experimental enterococcal endocarditis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 8: 564-570.

HUGENSCHMIDT, A.C. 1896. Experimental study of the different modes of protection of the oral cavity against pathogenic bacteria (Saliva). Dental Cosmos, 38: 797.

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

IKEDA, T.; SANDHAN, H.J. & BRADLEY, E.L. Jr. 1973. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. Archives of Oral Biology, 18: 555-556.

JABLON, J.M.; ZINNER, D.D. 1966. Differentiation of cariogenic streptococci by fluorescent antibody. J. Bact., 92: 1590-1596.

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

JOKINEN, M.A. 1970. Bacteraemia following dental extraction and prophylaxis. Suomen Hammaslaakariseuran Toimituksia 66: 69-100.

JORDAN, H.U.; ENGLANDER, H.R. & LIM, S.L. 1969. Potentially - cariogenic streptococci in selected population groups in the western hemisphere. Journal of the American Dental Association, 78: 1331-1335.

KALONAROS, I.U. & BAHN, A.N. 1965. Antigenic composition of the cell wall of *Streptococcus mitis*. Archives of Oral Biology, 19: 625-633.

- KANTZ, W.E. & HENRY, C.A. 1974. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Archives of Oral Biology*, 19: 91-96.
- KEENE, H.J. & SHKLAIR, I.L. 1974. Relationships of *Streptococcus mutans* caries status to the development of carious lesions in initially caries free recruits. *Journal of Dental Research*, 53: 1295-1296.
- KELSTRUP, J. & GIBBONS, R.J. 1969a. Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Archives of Oral Biology*, 14: 251-258.
- _____ & _____. 1969b. Inactivation of bacteriocins - in the intestinal canal and oral cavity. *Journal of Bacteriology*, 99: 888-890.
- _____ ; RICHMOND, S. ; WEST, C. & GIBBONS, R.J. 1970. Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and susceptibility. *Archives of Oral Biology*, 15: 1109-1116.
- KEYES, P.H. 1960. The infections and transmissible nature of experimental dental caries. *Archives of Oral Biology*, 1: 304-320.
- KNOX, K.W. & WICKEN, A.J. 1976. Grouping and cross-reacting antigens of oral lactic acid bacteria. *Journal of Dental Research*, 55: A116-A122.
- _____ ; MARKHAM, J.L. & WICKEN, A.J. 1976. Formation of cross-reacting antibodies against cellular and extracellular lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans*. BHT. In *Infection and Immunity*, 13: 647-652.

KOLSTAD, R.A. 1976. Strain typing of oral streptococci by the use of bacterial antagoism. Journal of Dental Research, 55: Special Issue A, A154-A165.

KRASSE, B. 1954. The proportional distribution of *Streptococcus salivarius* and other streptococci in various parts of the mouth. Odontologisk Revy, 5: 203-211.

_____ & CARLSSON, J. 1970. Various types of streptococci and experimental caries in hamsters. Archives of Oral Biology, 15: 25-32.

_____ ; JORDAN, H.V. & EDWARDSSON, S. 1968. The occurrence of certain "caries-inducing" streptococci in human dental plaque material with special reference to frequency and activity of caries. Archives of Oral Biology, 13: 911-918.

LANCEFIELD, R.C. 1925. The immunological relationships of *Streptococcus viridans* and certain of its chemical fractions obtained with antinucleoprotein sera. J. exp. Med., 42: 397.

_____. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. exp. Med., 57: 571-595.

LEACH, S.A.; APPLETON, J.; DADA, O. & HAYES, M.L. 1972. Some factors affecting the metabolism of fructan by human oral flora. Archives of Oral Biology, 17: 137-145.

LEBIEN, T.W. & BROMEL, M.C. 1975. Antibacterial properties of a peroxidogenic strain of *Streptococcus mitior* (mitis). Canadian Journal of Microbiology, 21: 101-103.

- LEHNER, T. 1975. Immunological aspects of dental caries and periodontal disease. *British Medical Bulletin*, 31: 125-130.
- _____ ; CHALLACOMBE, S.J. & CALDWELL, J. 1976. Immunologic basis for vaccination against dental caries in Rhesus monkeys. *Journal of Dental Research*, 55: C166-C180.
- LILJEMARK, W.F. & GIBBONS, R.J. 1972. Proportional distribution and relative adherence of *Streptococcus mitior* (mitis) on various surfaces in the human oral cavity. *Infection and Immunity*, 6: 852-859.
- LINEBERGER, L.T. & DE MARCO, T.J. 1973. Evaluation of transient bacteraemia following routine periodontal procedures *Journal of Periodontology*, 44: 757-761.
- LINZER, R. 1976. Serotype polysaccharide antigens of *Streptococcus mutans*: composition and serological cross-reactions. In *Immunological Aspects of Dental Caries*, eds Bowen, W.H.; Genco, R.J. & O'Brien, T.C. Washington DC & London: Information Retrieval Inc.
- _____ ; GILL, K. & SLADE, H.D. 1976. Chemical composition of *Streptococcus mutans* types c antigen: comparison to type a, b and d antigens. *Journal of Dental Research*, 55: A109-A115.
- LITTLETON, N.W.; KAREAASHI, S. & FITZGERALD, R.J. 1970. Recovery of specific caries-inducing streptococci from carious lesions in the teeth of children. *Archives of Oral Biology*, 15: 461-463.
- LOCKWOOD, W.R.; LAWSON, L.A.; SMITH, D.L.; McNEILL, K.M. & MOR-

- RISON, F.S. 1974. *Streptococcus mutans* endocarditis. Report of a case. *Annals of Internal Medicine*, 80: 369 - 370.
- LOESCHE, W.J.; ROWAN, J.; STRAFFON, L.H. & LOOS, P.J. 1975. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infection and Immunity*, 11: 1252-1260.
- MANLY, R.S. & RICHARDSON, D.T. 1968. Metabolism of levan by oral samples. *Journal of Dental Research*, 47: 1080-1086.
- MARKHAM, J.L.; KNOX, K.W.; WICKEN, A.J. & HEWETT, J. 1975. Formation of extracellular lipoteichoic acid by oral streptococci and lactobacilli. *Infection and Immunity*, 12: 378-387.
- MARSH, P.D.; HARDIE, J.M.; MCKEE, A.S. & BOWDEN, G.H. 1977. Specific and shared antigens within *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 11: 121-122 (abstract).
- MCCARTHY, C.; SNYDER, & PARKER, R.B. 1965. The indigenous oral flora of man. 1. The new born to the 1 year old infant. *Archives of Oral Biology*, 10: 61-70.
- MCGOWAN, D.A. 1975. Experimental endocarditis in prepared - rabbits infected with oral microorganisms. *Journal of Dental Research*, 54: Special Issue A, L 101 (abstract n° L406).
- _____ & HARDIE, J.M. 1974. Production of bacterial endocarditis in prepared rabbits by oral manipulation. *British Dental Journal*, 137: 129-131.
- MCKINNEY, R.M. & THACKER, L. 1976. Improvement in specificity-

ty of immunofluorescent reagents for identifying *Streptococcus mutans* by DEAE - cellulose - bacterial cell column immunosorption methods. *Journal of Dental Research* 55: A50-A57.

MEJARE, B. & EDWARDSSON, S. 1975. *Streptococcus milleri* (Guthor); an indigenous organisms of the human oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 20: 757-762.

MICHALEK, S.M.; SHIOTA, T.; IKEDA, T.; NAVIA, J.M. & MCGHEE, J. R. 1975. Virulence of *Streptococcus mutans*: biochemical and pathogenic characteristics of mutant isolates. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 150: 498-502.

MIKKELSEN, L. & POULSEN, S. 1976. Microbiological studies on plaque in relation to development of dental caries in man. *Caries Research*, 10: 178-188.

MIKX, F.H.M. & VAN DER HOEVEN, J.S. 1975. Symbiosis of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in mixed continuous culture. *Archives of Oral Biology*, 20: 407-410.

_____ ; _____ & WALKER, G.J. 1976. Microbial symbiosis in dental plaque studied in gnotobiotic rats and in the chemostat. *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries*, eds Stiles, H.M.; Loesche, W.J. & O'Brien, T.C. - Special Supplement to Microbiology Abstracts, 3: 763-771.

_____ ; _____ ; KONIG, K.G.; PLASSCHAERT, A.J.M. & GUGGENHEIM, B. 1972. Establishment of defined microbial ecosystems in germ free rats. 1. The effect of the interaction of *Streptococcus mutans* or *Streptococcus sanguis* with *Veillonella alcalescens* on plaque formation and cari-

es activity. *Caries Research*, 6: 407-410.

MILLER, W.D. 1890. The micro-organisms of the human mouth. Reprinted by Basel: S. Karger, 1973.

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

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

MIRICK, G.; THOMAS, L.; CURNEN, E. & HORSFALL, F. Jr. 1944. Studies on a non hemolytic streptococcus isolated from the respiratory tract of human beings III. Immunological relationship of streptococcus MG to *Streptococcus salivarius* Type 1. *Journal of Experimental Medicine*, 80: 431 - 440.

MONTAGUE, E.A. & KNOX, K.W. 1968. Antigenic components of the cell walls of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*, 54: 237-246.

NAKAMURA, T.; SUGINAKA, Y. & OBATA, T. 1976. Enzymatic action of oral *Bacteroides* against the dental plaque forming substance from streptococci. *Bulletim of the Tokyo Dental College*, 17: 107-122.

NEEFE, L.I.; CHRETIEN, J.H.; DELAHA, E.C. & GARAGUSI, V.I. 1974. *Streptococcus mutans* endocarditis. Confusion with enterococcal endocarditis by routine laboratory testing. *Journal of the American Medical Association*, 230: 1298-1299.

- NIVEN, C.F. Jr.; SMILEY, K.L. & SHERMAN, J.M. 1941a. The production of large amounts of a polyssaccharide by *Streptococcus dalivarius*. *Journal of Bacteriology*, 41: 479-484.
- _____ ; _____ & _____. 1941b. The polisaccharides-synthesized by *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus bovis*. *Journal of Biological Chemistry*, 140: 105-109.
- OKELL, C.C. & ELLIOT, S.D. 1953. Bacteraemia and oral sepsis with special reference to the actiology of subacute endocarditis. *Lancet*, 229: 869-872.
- OLIVEIRA, A.R. 1975. Considerações sobre antissoros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. *Summ. Phytopath.*, 1(1): 61-64.
- ORLAND, F.J.; BLAYNEY, J.R.; HARRISON, R.W.; REYNIERS, J.A. , TREXLER, P.C.; ERVIN, R.F.; GORDON, H.A. & WAGNER, M. 1955. Experimental caries in germ-free rats inoculated with enterococci. *Journal of the American Dental Ssociety* , 50: 259-272.
- OUCHTERLONY, O. 1949. Antigen - antibody reactions in gels. *Ark. Kemi. Geal.*, 266: 14.
- _____. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *In: Progress in Allergy*, S. Karger, Basel, New York, 5: 1-78.
- _____. 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *In: Progress in Allergy*, S. Karger, Basel. New York, 6: 30-154.
- PARKER, A.B. 1970. Paired culture interaction of the oral

- microbiota. *Journal of Dental Research*, 49: 804-809.
- PARKER, M.T. & BALL, L.C. 1976. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. *Journal of Medical Microbiology*, 9: 275-302.
- PARKER, R.B. & CREAMER, H.R. 1971. Contribution of plaque polysaccharides to growth of cariogenic micro-organisms. *Archives of Oral Biology*, 16: 855-862.
- PELLETIER, L.L. Jr.; DURACK, D.T. & PETERSDORF, R.G. 1975. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. IV. Further observations on prophylaxis. *The Journal of Clinical Investigation*, 56: 319-330.
- PEACH, B.; KJEMS, E. & RAVN, T. 1974. Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavia (B)*, 82: 357-370.
- PHILLIPS, I.; WARREN, C.; HARRISON, J.M.; SHARPLES, P.; BALL, L.C. & PARKER, M.T. 1976. Antibiotic susceptibilities of streptococci from the mouth and blood on patients treated with penicillin or lincomycin and clindamycin. *Journal of*
- PORTFIELD, J.S. 1950. Classification of the streptococci of subacute bacterial endocarditis. *J. Gen. Microbiol.*, 4: 92
- QURESHI, J.V.; GOLDNER, M., RICHE, W.H. Jr. & HARGREAVES, J. A. 1977. *Streptococcus mutans* serotypes in young school-children. *Caries Research*, 11: 141-152.
- TANTZ, L.A. & RANDALL, E. 1955. Use of autoclaved extracts of

hemolytic streptococci for serological grouping. Stanford Medical Bulletin, 13: 290-291.

ROGERS, A.H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. Applied Microbiology, 24: 294-295.

_____. 1973. The ecology of *Streptococcus mutans* in carious lesions and on caries-free surfaces of the same tooth. Australian Dental Journal, 18: 226-228.

_____. 1974. Bacteriocin production and susceptibility among strains of *Streptococcus mutans* grow in the presence of sucrose. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 6: 547-550.

_____. 1975. Bacteriocin types of *Streptococcus mutans* in human mouths. Archives of Oral Biology, 20: 853-858.

_____. 1976. Bacteriocinogeny and the properties of some bacteriocins of *Streptococcus mutans*. Archives Oral Biology, 21: 99-104.

ROSAN, B. 1973. Antigens of *Streptococcus sanguis*. Infection and Immunity, 7: 205-211.

_____. 1976. Relationship of the cell wall composition of groups H Streptococci and *Streptococcus sanguis* to their serological properties. Infection and Immunity, 13: 1144-1153.

RUTTER, P.R.; RUEFENACHT, W.G.; CHAMBERLAIN, C.R.; THOMASSEN, P.R.; ROSE, M. & SCRIVENER, C.A. 1961. The principle of bacterial antagonism applied as an aid in the reduction'

- of dental caries. *Journal of Dental Research*, 40: 1112-1115.
- RUSSELL, R.R.B. 1976. Classification of *Streptococcus mutans* strains by SDS gel electrophoresis. *Microbios Letters*, 2: 55-59.
- SABISTON, C.B. & GOLD, W.A. 1974. Anaerobic bacteria in oral infections. *Oral Surgery*, 38: 187-193.
- SANDE, M.A. & IRVIN, R.G. 1974. Penicillin-aminoglycoside synergy in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*, 129: 572-576.
- SCHACHTELE, C.F.; HARLANDER, S.K.; FULLER, D.W., ZOLLINGER, P. K. & LEUNG, W.L.S. 1976. Bacterial interference with sucrose-dependent adhesion of oral streptococci. *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries*, eds Stiles, H. M.; Loesche, W.J. & O'Brien, T.C. Special Supplement to *Microbiology Abstracts*, 2: 401-412.
- SCHAMSCHULA, R.G. & BARMES, D.E. 1970. A study of the streptococcal flora of plaque in caries free and caries active primitive peoples. *Australian Dental Journal*, 15: 377-382.
- SCHLEGEL, R. & SLADE, H.D. 1972. Bacteriocin production by transformable group H streptococci. *Journal of Bacteriology*, 112: 824-829.
- SCHLOSSMAN, S.F. and KABAT, E.A. 1962. Specific fractionation of a population of antidextran molecular with combining sites of various sizes. *J. exp. Med.*, 116: 535.

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

SCRIVENER, C.A. 1955. A possible dental caries prevention by microorganisms bacterial antagonists employed intraorally Journal of California State Dental Association and Nevada Dental Society, 31:151.

_____ ; MYERS, H.L. ; MOORE, N.A. & WAINER, B.W. 1950. Bacterial antagonism in the prevention of dental caries. Dental Stems of Interest, 72: 1239.

SEELEMANN, M. ; HADENFELDT, A. 1930. Zentr. Bakt., 1. Abt., Orig., 118: 331

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

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

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

_____ ; NIVEN, C.F. Jr. & SMILEY, K.L. 1943. *Streptococcus salivarius* and other non-hemolytic streptococci of the human throat. Journal of Bacteriology, 45: 249-263.

SHKLAIR, I.L. & KEENE, H.J. 1974. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mu*

- tans. Archives of Oral Biology, 19: 1079-1081.
- SIMS, W. 1974. The clinical bacteriology of purulent oral infections. British Journal of Oral Surgery, 12: 1-12.
- SOCRANSKY, S.S. & MANGANIELLO, A.D. 1971. The oral microbiota of man from birth to senility. Journal of Periodontology, 42: 485-494.
- _____ ; _____ ; PROPAS, D. ; ORAM, V. & VAN HOUTE, J. 1977. Bacteriological studies of developing supragingival dental plaque. Journal of Periodontal Research, 12: 90-106.
- SOLOWAY, M. 1942. A serological classification of viridans streptococci with special reference to those isolated from subacute bacterial endocarditis. J. exp. Med., 76: 109
- SOUTHWICK, F.S. & DURACK, D.T. 1974. Chemotherapy of experimental streptococcal endocarditis. III. Failure of a bacteriostatic agent (tetracycline) in prophylaxis. Journal of clinical Pathology, 27: 261-264.
- STACK, M.V. ; DONOGHUE, D.H. ; TYLER, J.E. & MARSHALL, M. 1973. Identification of oral streptococci with the use of standardized data from pyrolysis gas chromatography. Journal of Dental Research, 52: 969 (Abstract n° 145).
- SUNDQUIST, G. 1976. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea University Odontological Dissertations, No. 7.
- SWENSON, J.I. ; LILJEMARK, W.F. & SCHUMAN, L.M. 1976. A longitudinal epidemiologic evaluation of the association be-

- tween the detection of plaque streptococci and development of dental caries in children. Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries, eds Stiles, H.M.; Loesche, W.J. & O'Brien, T.C. Special Supplement to Microbiology Abstracts, 1: 211-222.
- SYMINGTON, J.M. 1975. Streptococci isolated from post-extraction bacteraemias. British Journal of Oral Surgery, 13: 91-94.
- TANZER, J.M.; FREEDMAN, M.L.; FITZGERALD, R.J. & LARSON, R.H. 1974. Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. Infection and Immunity, 10: 197-201.
- _____ ; _____ ; WOODIEL, F.N.; EIFERT, R.L. & RINEHIMER, L.A. 1976. Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries, eds Stiles, H.M.; Loesche, W.J. & O'Brien, T.C. Special Supplement to Microbiology Abstracts, 3: 597-616.
- THEILADE, E. & THEILADE, J. 1976. Role of plaque in the etiology of periodontal disease and caries. Oral Sciences - Reviews, 9: 23-63.
- THOMSON, L.A.; LITTLE, W. & HAGEAGE, G.J. 1976. Application of Fluorescent antibody methods in the analysis of plaque samples. Journal of Dental Research, 55: A80-A86.
- TINANOFF, N.; GROSS, A. & BRADY, J.M. 1976. Development of plaque on enamel. Parallel investigations. Journal of Periodontal Research, 11: 197-209.
- TOW, H.D. Jr. & SHKLAIR, I.L. 1967. The serological Relation

ships of certain cariogenic and potentially cariogenic streptococci, Report 67-06, Great Lakes, III: Naval Dental Research Institute.

VAN DER HOEVEN, J.S.; ROGERS, A.H. & MIKX, F.H.M. 1977. Inhibition of *A. viscosus* by bacteriocin-producing gnotobiotic rats. *Journal of Dental Research*, 56: Special Issue A: A132. Preprinted abstract 357.

VAN HOUTE, J. & JANSEN, H.M. 1968. Levan degradation by streptococci isolated from human dental plaque. *Archives of Oral Biology*, 13: 827-830.

_____ ; _____ & BELLACK, S. 1971. Proportions of *Streptococcus sanguis*, an organism associated with subacute bacterial endocarditis, in human faeces and dental plaque. *Infection and Immunity*, 4: 658-659.

VERNAZZA, T.R. & MELVILLE, T.H. 1977. Bacteriocin-like activity in strains of *Streptococcus mitis*. International Association for Dental Research. British Division. Preprinted abstract. 76.

WASHBURN, M.R.; WHITE, J.C. & NIVEN, C.F. Jr. 1946. *Streptococcus S.B.E.*: immunological characteristics. *Journal of Bacteriology*, 51: 723-729.

WHITE, J.C. & NIVEN, C.F. Jr. 1946. *Streptococcus S.B.E.*: A streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. *Journal of Bacteriology*, 51: 717-722.

WILLIAMS, R.E.O. 1956. *Streptococcus salivarius* (Vel hominis) and its relations to Lancefield's group K. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 72: 15-25.

- WITTGOW, W.C. Jr. & SABISTON, C.B. Jr. 1975. Micro-organisms - from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *Journal of Endodontics*, 1: 168-171.
- WOOD, J.M. 1964. Polysaccharide synthesis and utilization by dental plaque. *Journal of Dental Research*, 43: 955 (Abstract).
- _____. 1969. The state of necrose sugar in human dental plaque and its metabolism by the plaque bacteria. *Archives of Oral Biology*, 14: 161-168.
- WOODS, R. 1971. Dental caries susceptibility test based on the occurrence of *Streptococcus mutans* in plaque material. *Australian Dental Journal*, 16: 116-121.
- YAMAMOTO, T.; IMAI, S.; NISIZAWA, T. & ARAYA, S. 1975. Production of, and susceptibility to, bacteriocin-like substances in oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, 20: 389-391.
- YANO, T. 1976. Estudo bacteriológico e serológico de algumas amostras pertencentes a vários patotipos de *Xanthomonas campestris* (PAMMEL) DOWSON. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 65 pp.
- ZINNER, D.D. & JABLON, J.M. 1968. Humana streptococcal strains in experimental caries. In the Art and Science of Dental Caries Research, ed. Harris, R.S., London & New York: Academic Press.
- _____; _____; ARAN, A.P. and SASLAW, M.S. 1965a. Experimental caries induced in animals by streptococci of human origin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 118: 766.