

## ЗАСТАПЕНОСТА НА STREPTOCOCCUS MUTANS И LACTOBACILLUS ВО ПЛУНКАТА И ДЕНТАЛНИОТ КАРИЕС

Јанкуловска М.<sup>1</sup>, Петрова М.<sup>3</sup>, Накова  
М.<sup>2</sup>, Павлевска М.<sup>1</sup>, Горѓиевска Е.<sup>1</sup>,  
Петановски Х.<sup>1</sup>

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје,  
<sup>1</sup>Катедра за детска и превентивна стоматологија,  
<sup>2</sup>Катедра за пародонтологија и орална патологија  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - Скопје,  
<sup>3</sup>Институт за микробиологија со паразитологија

## PRESENCE OF STREPTOCOCCUS MUTANS AND LACTOBACILLUS IN SALIVA AND ITS RELATIONSHIP WITH DENTAL CARIES

Jankulovska M.<sup>1</sup>, Petrova M.<sup>3</sup>, Nakova M.<sup>2</sup>,  
Pavlevska M.<sup>1</sup>, Gorgievska E.<sup>1</sup>,  
Petanovski H.<sup>1</sup>

FACULTY OF DENTAL MEDICINE – Skopje,  
<sup>1</sup>Department of Pediatric and Preventive Dentistry,  
<sup>2</sup>Department of Parodontology and Oral pathology  
FACULTY OF MEDICINE - Skopje,  
<sup>3</sup>Department of Microbiology

Современиите трендови во стоматолозијата појврдуваат дека саливарниите SM се од особена важност за иницијацијата на дениталниот кариес, додека микроорганизмите од родот на лактобацили се важни за понатамошниот развој на кариозната лезија. Микробиолошките испитувања на плунката може да се применат како помошни средства во дијагнозата, прејманот и превенцијата на дениталниот кариес.

Во овој контекст е целта на нашето испитување, да се детерминира саливарната колонизација со SM и LB, во корелација со саливарното pH и кариес активностите.

Во студијата, беа опфатени 60 испитаници, на возраст од 13 – 17 години, со исти хигиено – диететски навики и добро здравје, со исклучок на дениталниот кариес. Испитаниците беа поделени според КЕП индексот во две групи: кариес резистентни (КЕП - 0-3) и кариес активни (КЕП над 10).

pH во стимулирана плунка беше детерминиран со pH – метар Iskra 5730.

Степенот на колонизација на плунката со SM и LB беше мерен со примена на CRT плесето на Vivadent, Лихтенијајн.

Recent years, Mutans streptococci have been associated in particular with early demineralization while lactobacilli are implicated more with lesion progression and cavitation and they are important indicators about relative caries activity and diet-hygiene manners. Just because of that, many authors suggested that the numbers of salivary SM and LB can be useful diagnostic and prognostic indicators of dental decay.

In this context is the purpose of our study, to estimate the salivary colonization with SM and LB, in correlation with salivary pH and carious activity.

60 children, aged 13-17, with the same diet-hygienic regime, in good health, except dental caries, take place in our examination. According to their DMF – index (WHO- criteria), they were divided in two groups: caries - resistant, with DMF – index from 0-3 and caries - active, with DMF – index over 10.

pH in stimulating saliva was measured with pH-meter Iskra 5730.

The degree of colonization with SM and LB was measured in paraffin-stimulated saliva with DIP-Slide method of Larmas (Dentocult SM and Dentocult LB). The concentration of microorganisms is assayed by comparing the density of the colonies present on the standard testing slide, expressed by the numbers of colony-forming units (CFU) per ml. saliva.

Нашиите резултати покажаа високо ниво на саливарни  $SM-10^6$  col./ml. плунка и саливарни  $LB-10^5$  col./ml. кај кариес активниите испитаници каде плунковниот Ph изнесуваше 6,8; и ниски вредности на саливарни  $SM-10^5$  col./ml. плунка и  $LB-10^3$  col./ml. плунка кај кариес резистентните испитаници каде саливарниот Ph изнесуваше 7,4.

**Клучни зборови:** превентивна стоматологија, орална хирургија, флуориди, саливарна микрофлора, Streptococcus mutans, Lactobacillus, кариес активитет

Денталниот кариес претставува локализиран постеруптивен патолошки процес кој предизвикува деструкција на тврдите забни ткива. Тој е мултикаузално заболување, резултат на интеракцијата на повеќе фактори во оралниот медиум, како што се постоењето на приемчив домаќин, кариогени микроорганизми и погоден супстрат, присутни одреден временски интервал.

Доминантно кариогени микроорганизми кои се присутни во плунката, денталниот плак и јазикот припаѓаат на родот на Streptococcus и Lactobacillus.

Streptococcus Mutans се неподвижни, ацидогени и ацидурични, Gram позитивни коки. Тие се карактеризираат со повеќе особини кои се важни за развојот на кариозниот процес:

- ги колонизираат забните површини;
- синтетизираат нерастворливи екстрацелуларни полисахариди (глюкани), кои го овозможуваат нивното адхерирање на мазните површини и, најверојатно, го иницираат развојот на кариозната лезија, како и интрацелуларни полисахариди кои овозможуваат продукција на киселини во отсуство на прилив на шеќери во нивната екосредина;
- ги ферментираат шеќерите формирајќи млечна киселина, која е особено важна за одвивањето на деминерализацијата на мазните забни површини (1, 3, 4, 7).

Our results show a high number of salivary  $SM-10^6$  col./ml. saliva and salivary  $LB-10^5$  col./ml. in caries active group of examineers were salivary Ph was 6,10; but low salivary levels of  $SM-10^5$  col./ml. saliva and  $LB-10^3$  col./ml. saliva at caries resistant patients, where salivary Ph was 6,52.

**Key words:** preventive dentistry, oral hygiene, fluorides, salivary microflora, Streptococcus mutans, Lactobacillus, caries activity

Caries is a multicausal disease involving interaction of the host, the oral microflora and the substrate (primarily sucrose). In order for breakdown of tooth structure to occur, there must be a susceptible host, cariogenic microorganisms and a suitable substrate present for a sufficient length of time.

The predominant cariogenic organisms, present in saliva, dental plaque and tongue, are of the genus Streptococcus, with Streptococcus mutans, Lactobacillus and another organism implicated in certain types of carious lesions is the Actinomyces. These organisms are gram-positive and non-motile and may occur as rods or long, sometimes branching filaments. Actinomyces ferment glucose, producing lactic and other acids. They are the most common organisms in subgingival and root-surface plaque. They are important in the formation of root surface caries as well as certain types of periodontal disease. The most important species are A naeslundii and A viscosus (9, 10, 13, 14).

S. mutans are non-motile, acidogenic and aciduric, gram positive cocci. They have several properties that are important in the carious process.

- First, they colonize on tooth surfaces.
- Second, they synthesize insoluble polysaccharides (glucans) from sucrose which allows adhesion to smooth surfaces and appears to be important in the formation of smooth surface caries.

*Streptococcus Mutans* се присутни во оралниот медиум само доколку се присутни цврсти површини, како што се забите и протетските помагала. Тие се пренесуваат од млечната на трајната дентиција преку саливарна контаминација, а можат да бидат пренесувани и меѓу особи. Мајките се сметаат за примарни извори со SM за своите деца (3, 4, 6).

*Fredy Gamboa1* и сор. сметаат дека трансферот на бактериите може да се одвива директно преку плунката или со заедничка употреба на предмети како што се четкичките за заби или приборот за јадење, доколку се контаминирани со плунка. (16)

*Van Houte* и *Green* (12) претпоставуваат дека саливарната концентрација на SM може да биде одлучувачка за нивниот естаблишмент на забните површини.

Друг микроорганизам кој е важен за развојот на кариесот е од родот на *Lactobacillus*. Тие се Gram-позитивни, ацидогени и ацидурични и не создаваат спори. Забите не се неопходни за нивниот естаблишмент, но затоа може да се сретнат на дорзумот на јазикот и имаат особен афинитет кон дентинот од длабоките кариозни лезии и ретентивните места. Тие сочинуваат мала фракција од оралната микрофлора и се важни повеќе за континуитетот на кариозниот процес, отколку за неговата иницијација. Високото саливарно ниво е во директна асоцијација со конзумирањето и фреквенцијата на конзумирање на јагленохидратните оброци. Има повеќе видови, од кои најчесто среќавани во оралниот медиум се *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* и други. Доминантен вид присутен во деналниот плак и кариозниот дентин е *Lactobacillus casei*. (1, 11, 14, 16)

*Roeters* и сор. (19) известуваат дека пред двегодишна возраст лактобацилите се карактеризираат со ниско саливарно ниво, транзиторно присуство и со позитивна корелација меѓу саливарното ниво кај мајките и нивните деца. Тие, присуството на лактобацилите во плунката го поставуваат во дирек-

- Third, they ferment sucrose to form lactic acid which is a strong acid effective in demineralization of tooth structure (5, 6, 7, 8).

*S. mutans* are present in the mouth only when a solid surface such as teeth or dentures are present. They are transmitted from the primary to the permanent dentition through salivary contamination and can also be transmitted between individuals. Mothers are thought to be primary source of SM for their children.

*Fredy Gamboa1 et al.* ascribe that the transfer might occur directly via saliva or by the use of domestic items such as toothbrushes and spoons contaminated with saliva. (16)

*Van Houte and Green* think that the salivary concretations of SM could be crucial in their establishment on the tooth surface. (12)

Another organism that is important in the development of caries is *Lactobacillus*. *Lactobacilli* are gram-positive, non-spore-forming, acidogenic and aciduric rods. They have a low affinity for the tooth surface but favor the dentin of deep carious lesions as a habitat. They normally constitute only a small fraction in oral microflora and are important not in the initiation but in the continuation of caries. There are many different *Lactobacillus* species. *L. casei* is the predominant species in dental plaque and carious dentin. (1, 11, 14, 16)

*Roeters et al.* (19) reported that before the age of two year, *lactobacilli* are recovered in low numbers and very often they seem to be present transiently. They think that there is a positive correlation between count of salivary *Lactobacilli* in mothers and their children, which is depend by the diet (sugar content), oral hygiene, the age and relative carious risk.

Another organism implicated in certain types of carious lesions is the *Actinomyces*. These organ-

тна зависност со начинот на исхрана (присуството на шеќерите), орално-хигиенските навики, возраста и релативниот кариес ризик.

Иако, генерално, SM и LB, долги години беа истакнувани како главни предизвикувачи на денгалниот кариес, *Carin L.*, потврдува дека саливарните SM се од особена важност за иницијацијата на денгалниот кариес, додека микроорганизмите од родот на лактобацили се важни за понатамошниот развој на кариозната лезија (13, 16).

Микробиолошките испитувања на плунката може да се применат како помошни средства во дијагнозата, третманот и превенцијата на денгалниот кариес.

Во тој контекст е целта на нашето испитување, да се детерминира саливарната колонизација со SM и LB и саливарното pH во корелација со кариес активитетот.

## Материјал и метод

Во нашата студија, беа опфатени 60 испитаници, на возраст од 13 – 17 години, со исти хигиено – диететски навики и добро здравје, со исклучок на денгалниот кариес. Испитаниците не беа третирани со антибиотици во последните месец дена и според КЕП индексот беа поделени во две групи:

- кариес резистентни (КЕП - 0-3) и
- кариес активни (КЕП над 10).

При тоа, беа направени следните испитувања:

- Клинички испитувања;
- Лабораториски испитувања;
- Микробиолошки испитувања и
- Статистички испитувања.

При клиничкиот преглед направен со сонда и стоматолошко огледалце кај испитаниците се изврши:

- одредување на КЕР индексот (вкупниот број на кариозни, екстрахирани и пломбирани заби) со помош на Klein-Palmer-овиот систем.

pH во стимулирана плунка беше детерминиран со pH – метар Iskra 5730.

isms are gram-positive and non-motile and may occur as rods or long, sometimes branching filaments. Actinomyces ferment glucose, producing lactic and other acids. They are the most common organisms in subgingival and root-surface plaque. They are important in the formation of root surface caries as well as certain types of periodontal disease. The most important species are *A. naeslundii* and *A. viscosus* (1).

*Carin L.*, accepts that salivary SM are associated with initial of caries, but lactobacilli with the further development of the lesion. Generally, SM and LB have been strongly implicated as causative organisms of dental caries. Just because of that, many authors suggested that the numbers of salivary SM and LB can be useful diagnostic and prognostic indicators of dental decay (13,16).

In this context is the purpose of our study, to estimate the salivary colonization with SM and LB, in corelation with salivary pH and carious activity.

## Material and method

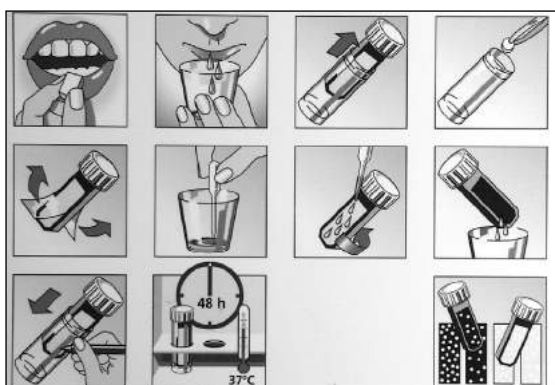
60 children, aged 13-17, with the same diet-hygienic regim, in good health, except dental caries, take place in our examination. According to their DMF – index (WHO- criteria), they were divided in two groups:

- caries - resistant, with DMF – index from 0-3 and
- caries - active, with DMF – index over 10.

The following examinations were made:

- Clinical examinations;
- Laboratory examinations;
- Microbiological examinations and
- Statistical examination

Степенот на колонизација на плунката со SM и LB беше мерен во парафин стимулирана плунка со DIP slide методата на Larmas (CRT тестот на Вивадент од Лихтенштајн). Стриповите се накапуваат со плунка и се поставуваат во епрувети со табетка Vasitracin, која треба да го оневозможи, инхибира растот на други соеви. Потоа следи инкубација на 37°C во текот на два до три дена (слика 1). Концентрацијата на бактериите се испитува со компарирање на густината на колониите присутни на стандардниот тест стрип, изразено во број на формирани колонии на милилитар плунка (colony-forming units – CFU per ml. saliva – CFU/ml). Вредностите повисоки од  $10^5$  бактериски колонии/мл плунка се индикатор за висока предиспонираност кон кариес односно висок кариес ризик (слика 2) (2, 16).



Слика 1. Тест картица SM

During the clinical examinations, determination of the DMF index was made with *Klein-Palmer* method.

PH in stimulating saliva was measured with pH-metar Iskra 5730.

The degree of colonization with SM and LB was measured in paraffin-stimulated saliva with DIP-Slide method of Larmas (Dentocult SM and Dentocult LB). Saliva is “dipped” or poured over the slide. Following incubation on 37°C, 2-3 days (figure 1). The concentration of microorganisms is assayed by comparing the density of the colonies present on the standard testing slide, expressed by the numbers of colony-forming units (CFU) per ml. saliva (figure 2) (2, 16).

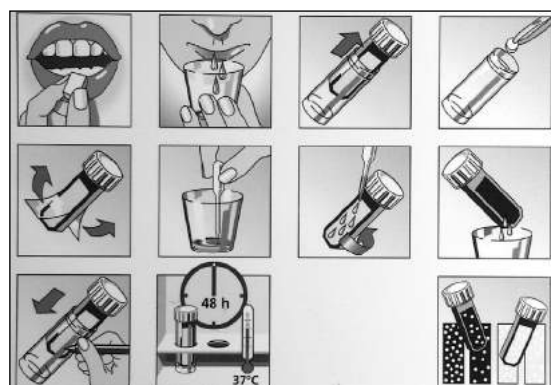
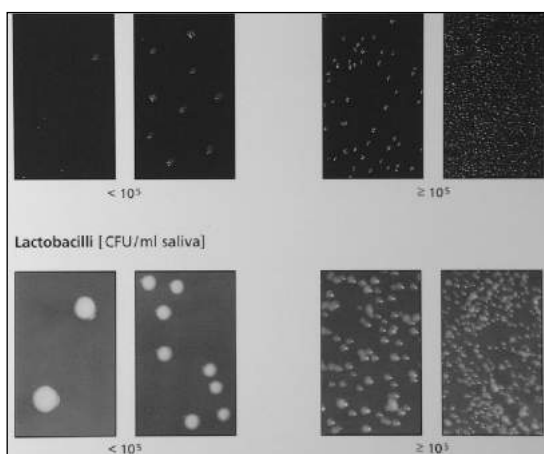


Figure 1. Testing slide SM



Слика 2. Тест картица LB

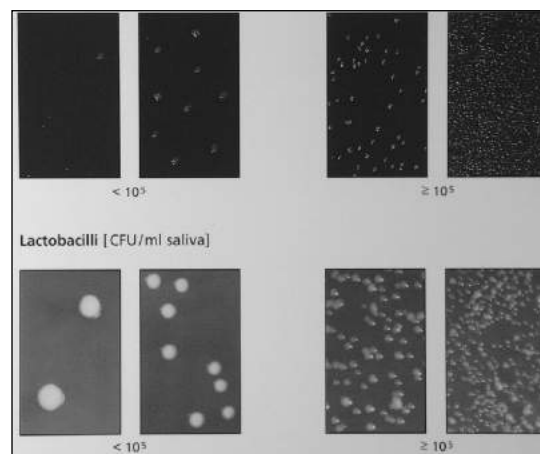
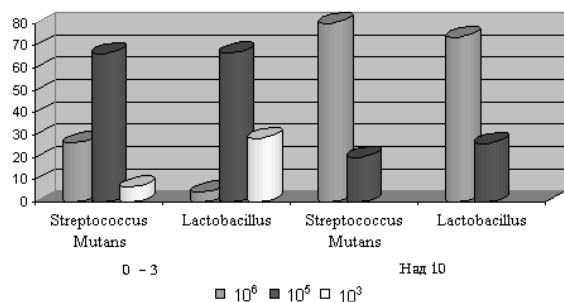


Figure 2. Testing slide LB

## Резултати и дискусија

Истражувањата спроведени во последните години говорат за директна асоцијација меѓу нивото на саливарните SM и раната деминерализација на деналните површини, додека LB се поврзуваат повеќе со прогресијата на кариозната лезија, хигиено – диететските навики и релативниот кариес активитет кај пациентите.

Нашите резултати покажаа високо ниво на саливарни SM и LB –  $10^6$  col./ml. плунка (графикон 1) кај најголем број на кариес активни испитаници со  $\text{КЕП-}\bar{X} \pm \sigma = 12,3 \pm 2,8$  (табела 1) каде плунковниот Ph изнесуваше 6,8; но ниски вредности на саливарни SM и LB –  $10^5$  col./ml. плунка и  $10^3$  col./ml. плунка



$10^9/ 10^5/ 10^6$  ЦФУ/ml saliva - број на формирани колонии на еден милилитар плунка.

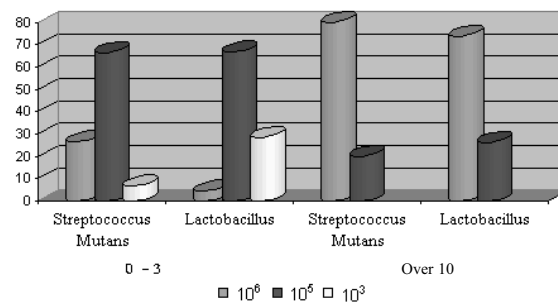
**Графикон 1.** Степен на колонизација на плунката со SM и Lb кај двете испитувани групи (%)

## Results and Discussion

Recent years, Mutans Streptococci have been associated in particular with early demineralization while lactobacilli are implicated more with lesion progression and cavitation and they are important indicators about relative caries activity and diet-higiene manners (1).

Table 1 reports for the significant difference in the values of the DMF at the both group of examineers (Student-“t”=20,5 for  $p < 0,001$ ).

Our results show a high number of salivary SM– $10^6$  col./ml. saliva and salivary LB– $10^5$  col./ml. in caries active group of children (chart 1) were salivary Ph was 6,10; but low salivary lev-



$10^9/ 10^5/ 10^6$  CFU/ml saliva – colony forming units per ml saliva

**Chart 1.** Salivary SM and LB colonization at the both groups of examineers (%)

**ТАБЕЛА 1. ВРЕДНОСТИ НА КЕП ИНДЕКСОТ КАЈ ДВЕТЕ ИСПИТУВАНИ ГРУПИ**

КЕП	$\bar{X} \pm \sigma$	min	max	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	“t”	p
0-3	$1,0 \pm 1,1$	0	3	11,3	20,5	<0,001****
Над 10	$12,3 \pm 2,8$	10	21			

**TABLE 1. DMF INDEX AT THE BOTH GROUPS OF EXAMINEERS**

DMF	$\bar{X} \pm \sigma$	min	max	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	“t”	p
0-3	$1,0 \pm 1,1$	0	3	11,3	20,5	<0,001****
Over 10	$12,3 \pm 2,8$	10	21			

ТАБЕЛА 2. рН НА ПЛУНКАТА КАЈ ДВЕТЕ ИСПИТУВАНИ ГРУПИ

КЕП индекс	n	$\bar{X} \pm \sigma$	min	max	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	“t”	p
0-3	30	7,4±0,11	6,86	7,94			
					0,598	4,7	<0,001****
Над 10	30	6,802±0,47	6,66	6,94			

TABLE 2. SALIVARY pH AT THE BOTH GROUPS OF EXAMINEERS

DMF index	n	$\bar{X} \pm \sigma$	min	max	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	“t”	p
0-3	30	7,4±0,11	6,86	7,94			
					0,598	4,7	<0,001****
Over 10	30	6,802±0,47	6,66	6,94			

(табела 3, графикон 1) кај поголем број на кариес резистентните испитаници со КЕП- $\bar{X} \pm \sigma = 1,0 \pm 1,1$  (табела 1) каде саливарниот Ph изнесуваше 7,4 (табела 2).

Овие резултати се во корелација со резултатите на *Twetman S.* и *сop.* (21) и *Simon L.* (20) кои говорат за позитивна корелација меѓу различните нивоа на саливарни SM и LB и кариес активитетот.

Во овој контекст, *Bratthall D. et al.* (3,4,5,6) и *Leal S. C., Mickenautsch S.* (16) истакнуваат дека овие микроорганизми интерферираат со иницијалните кариозни лезии, диететскиот режим (особено јаглено-хидратната содржина) и оралната хигиена.

*Becker et al.* и *Bowen W. H.* (1, 2) сметаат дека SM претставуваат најважниот етиолошки фактор на деналниот кариес кај човекот, додека LB се секундарни предизвикувачи на кариес.

Кај групата на кариес активни испитаници измерени се пониски вредности на плунковниот рН во однос на групата на кариес резистентни испитаници. Нивната разлика е статистички сигнификантна што секако претставува потврда за влијанието на киселоста на плунката врз застапеноста на SM и LB во плунката, на појавата на деналниот кариес, но и предизвик за осветлување на точниот механизам на делување.

els of SM-10<sup>-5</sup> col./ml.saliva and LB-10<sup>-3</sup> col./ml. saliva at caries resistant patients, where salivary Ph was 6,52 (table 2). The significant difference in salivary pH at the both groups probably is one more prove for the influence of the salivary acidogenicity to the SM and Lb colonization and dental caries incidence. Low salivary levels of SM-10<sup>-5</sup> col./ml. saliva and LB-10<sup>-3</sup> col./ml. saliva at caries resistant patients is an indicator for the association beetwen salivary colonization with both of these microorganisms and dental caries prevalence (chart 1).

In this context are the results from several past examinations were we found a strong correlation beetwen the salivary colonization with SM and Lb, dental caries morbidity and diet-hygiene manners. (11, 12)

This is in corelation with the results of *Twetman S.* et al. (21) and *Simon L.* (20) who found a positive corelation between different levels of salivary SM and LB and the caries experience.

*Bratthall D. et al.* (3,4,5,6) and *Leal S. C., Mickenautsch S.* (16) think that these microorganisms interface with initial caries lesion, diet (sugar content), and oral hygiene.

Намален степен на колонизација на плунката со SM и LB беше детерминиран кај испитаниците со ниски вредности на КЕП индексот во однос на кариес активните испитаници, што од своја страна претставува индикатор за поврзаноста на степенот на колонизација на плунката со овие микроорганизми и кариес преваленцата.

Во прилог на ова се резултатите од две наши студии, спроведени пред неколку години, во кои си поставивме за цел да го одредиме степенот на колонизација на плунката со *Streptococcus Mutans* и *Lactobacillus* кај деца со различен кариес активитет, при што беше утврдена јака корелација меѓу застапеноста на овие микроорганизми во плунката, кариес морбидитетот, како и хигиено-диететскиот режим. (11, 12)

Степенот на колонизација на плунката со SM и LB, со примената на современи тестови од страна на стручни лица (стоматолози), како и од самите пациенти по претходна стоматолошка едукација, може да се примени како индикатор во детерминирањето на кариес ризикот и изработката на индивидуален кариес ризик профил.

Зголемениот број на формирани колонии на *Streptococcus mutans* и *Lactobacillus species* во денгалниот плак и плунката, како и наодите на многу низок рН и CRT – Buffer капацитет на плунката, се индикатор за зголемен ризик од денгалниот кариес.

Очигледно е дека колку порано го дијагностицираме денгалниот кариес толку конзервативни ќе бидеме во неговиот третман. Токму поради тоа од особена важност е детерминирањето на кариес активитетот на секоја промена на тврдите забни ткива и изработка на индивидуален кариес ризик профил за секој пациент, кој базира на неговата кариес историја, саливарниот клиренс и микрофлора, хигиено-диететските навики и присуството или отсуството на примена на флуоридни препарати. Анализата на овие податоци ќе не доведе до правилната одлука за соодветна реставративна процедура.

*Becker et al.* and *Bowen W. H.* considered that SM implicated as the most important etiological agent of human dental caries, until LB is the secondary causative agent (1, 2).

It is obvious that the big number of colony-forming units (CFU) per ml. saliva of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus species* in dental plaque and saliva, low salivary pH and low CRT – Buffer capacity of saliva are the indicators for the increasing risk of dental decay.

In summary, we can confirm that the etiology of dental caries is multifactorial and involves cariogenic oral microflora, a susceptible host and a suitable substrate. Any attempt to fight with or control dental caries must take into account the complex interplay of numerous factors like educating all individuals about the etiology of dental caries and motivating them to take care of their own oral health. At the same time it is our obligation to use every possible preventive and therapeutic measures (preparing a patient's profile for susceptibility to dental caries, removing all retentional sites in the mouth, fissure sealing, sanation of dental caries lesions and fissure filling); combination of fluoride treatment and recommendation for correct diet-hygiene regime.



## Литература / References

1. Becker, M. R., B. J. Paster, et al. (2002). "Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries." *Journal of Clinical Microbiology* 40(3): 1001-1009.
2. Bowen W. H.: Salivary influences on the oral microflora, *Saliva and Oral Health*, Edgar, W. M., O'Mullane, D. M., British Dental Association, London, pp. 95-103, 1996.
3. Bratthall D., Ericsson D.: Tests for assessment of caries risk, in Thulstrup A., Fejerskov, O., *Textbook of clinical cariology*. Munksgaard, Copenhagen, 2nd. 333:335, 1994.
4. Bratthall D.: Mutans Streptococci - dental, oral and global aspects; *J Indian Soc Pedo Prev Dent* 9:4-12, 1991.
5. Bratthall D.: Mutans Streptococci - Oral Health, Faculty of Odontology, Lund University, Malmo - Sweden, 10:52, 1998.
6. Bratthall D.: Demonstration of five serological groups of Streptococcal strains resembling Streptococcus mutans. *Odontol Revy*, 21:143-152, 1995.
7. Carlsson P.: On the Epidemiology of mutans Streptococci, Thesis, Lund University, 1:104, 1988.
8. Carlsson Peter: Distribution of mutans Streptococci in populations with different levels of sugar consumption *N 2:vol. 97:120*, 1989.
9. Chestnutt I. G., MacFarlane T. W., Aitchison T. C., Stephen K. W.: Evaluation of the in vitro Cariogenic Potential of Streptococcus mutans Strains Isolated from 12-Year-Old Children with Differing Caries Experience, *Caries Res.*, 29, 455-460, 1995.
10. Clark J.K.: On the bacterial factor in the Aetiology of dental caries, *Brit.J.Exp. Patol.* 5, 141:147, 1924.
11. Cristiane Yumi Koga-Ito, Clélia Aparecida de Paiva Martins, Ivan Balducci, Antonio Olavo Cardoso Jorge: Correlation among mutans streptococci counts, dental caries, and IgA to Streptococcus mutans in saliva, *Braz. oral res.* vol.18 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2004,
12. Houte Van J.: Role of micro-organisms in caries etiology, *J Dent Res*; 73(3):672-81, 1994.
13. Јанкуловска М., Мирчева М., Петрова М.: Степенот на колонизација на плунката со Streptococcus Mutans кај пациенти со различен кариес активитет, 2. Конгрес на стоматолозите од Македонија (Апстракт). Охрид : Здружение на стоматолозите од Македонија, 12, 1998.
14. Fredey Gamboa1, Mabel Estupiñan1, Adriana Galindo1: Presence of Streptococcus Mutans in saliva and its relationship with dental caries: Antimicrobial susceptibility of the isolates, *Universitas scentarum Revista de la Facultad de Ciencias, pontificia Universidad Javeriana, Scientiarum* 2010, Vol 9, 23-27
15. Jankulovska M., Mirčeva M., Petrovska M., Gorgev D., Žabokova-Bilbilova E., Gorgievska E.: Salivary Streptococcus Mutans and Lactobacillus and etiology of dental caries, 5<sup>th</sup> Congress of the Balkan Stomatological Society, (Abstract), 113, 2000.
16. Leal S. C., Mickenautsch S.: Salivary Streptococcus Mutans count and caries outcome, *J Minim Interv Dent* 2010; 3 (4), 137-147
17. Loveren, C. V., J. F. Buijs, et al. (2000). "Similarity of Bacteriocin Activity Profiles of Mutans streptococci within the Family When the Children Acquire the Strains After the age of 5." *Caries Research* 34(6): 481-5
18. Richardson L., McKibbins S.M., Seibert W., Tyus J.: Salivary count of streptococcus mutans in elementary school children; *NDA J* 46(2), 8:11, 1995.
19. Roeters F. J. M., van der Hoeven J. S., Burgesdijk R. C. W., Schaeken M. J. M.: Lactobacilli, Mutans Streptococci and Dental Caries: A Longitudinal Study in 2-Year-Old Children up to the Age of 5 Year, *Caries Res.*, 29, 272-279, 1995.
20. Simon L.: The Role of Streptococcus mutans And Oral Ecology in The Formation of Dental Caries, *Lethbridge Undergraduate Research Journal*. 2007. Volume 2 Number 2.
21. Twetman S., Petersson L. G., Pakhomov G. N.: Caries Incidence in Relation to Salivary mutans Streptococci and Fluoride Varnish Applications in Preschool Children from Low- and Optimal-Fluoride Areas, *Caries Res.*, 30, 347-353, 1996.
22. Vehkalahti M., Nikula-Sarakorpi E., Paunio I.: Evaluation of Salivary Tests and Dental Status in Caries Increment in Caries-Susceptible Teenagers, *Caries Res.*, 30, 22-28, 1996.