

ARTÍCULO
ORIGINALDra. Nelly Molina Frechero.^{1*}Dr. Raúl Enrique
Castañeda Castaneira.²QFB Rosa Eugenia
Reyes Reyes.³**1 Dra. en Ciencias Odontológicas.**
Profesor Titular C.
Departamento de Atención a la
Salud. División de Ciencias
Biológicas y de la Salud
UAM-Xochimilco.**2 Médico pediatra.**
Profesor Titular C.
Departamento de Atención a la
Salud. División de Ciencias
Biológicas y de la Salud
UAM-Xochimilco.**3 Químico Fármaco Biólogo**
Profesor Titular C.
Departamento de Sistemas
Biológicos. División de Ciencias
Biológicas y de la Salud.
UAM-Xochimilco.

*Correspondencia

Dra. Nelly Molina Frechero.
Universidad Autónoma
Metropolitana Xochimilco.
Calzada del Hueso N° 1100.
Colonia Villa Quietud.
Delegación Coyoacán.
C.P. 04960 México D.F.
Teléfono y fax: 54837182.
nmolina@cueyatl.uam.mx

Streptococcus mutans en escolares de 6 y 11 años de edad

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la presencia de *Streptococcus mutans* en saliva y determinar el nivel de infección en escolares de seis y 11 años de edad de una escuela estatal en Iztacalco, en la Ciudad de México. La población de estudio estuvo constituida por 109 escolares de ambos sexos, 57 de seis años y 52 de 11 años.

El nivel de infección se determinó por la cuantificación de *S. mutans* en *Mitis Salivarius Agar* con bacitracina al 0.2 U/ml y sacarosa al 20%, clasificándose en bajo y alto. Además, se determinó el consumo de productos azucarados.

Los resultados indican que en la población estudiada, el nivel de *S. mutans* en los escolares de seis años fue bajo en 12 casos (21.02%) y alto en 41 (71.82%), donde sólo cuatro niños se encontraron libres de infección. En el grupo de 11 años, dos niños (3.84%) se hallaron en nivel bajo y 49 niños (94.08%) en alto, mientras que un niño permaneció libre de infección.

El grado de infección fue superior en niños de mayor edad; se registró una relación significativa con un alto consumo de productos azucarados.

Es necesario implementar medidas preventivas en las escuelas para disminuir el consumo de azúcares y correctos hábitos de higiene oral para evitar la formación de placa dentobacteriana.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, infección en saliva, productos azucarados.

ABSTRACT

The aim of the present study was to study the presence of *Streptococcus mutans* in saliva and determine the level of infection in schoolchildren of six and eleven years of age of Iztacalco D.F.

The study populations was constituted by 109 students of both sexes, 57 of six years and 52 of 11 years of age.

The infection level determined by the quantification of *S. mutans* in *Mitis Salivarius Agar* with bacitracin to the 0.2U/ml and saccharose to 20%. In addition the sweetened product consumption was determined.

The results indicated that in the studied population the level of *S. mutans* in saliva was in six years old: low in 12 cases (21.02%) and high in 41 cases (71.82%) and only four children were free of infection. In the group of 11 years old, two children were in low level and 49 in high level (3.84% and 94.08%, respectively), while only one children remained itself free of infection.

The found degree of infection was superior in children of greater age, which can be due to many factors. In the study was relation with a high sweetened product consumption.

It is necessary to implement preventive measures in the schools to diminish the sugar consumption and to establish measures of education of oral hygiene that cause the formation of dentobacteriana plaque.

Key words: *Streptococcus mutans*, saliva infection, children.

Introducción

Los estreptococos son bacterias esféricas ordenados en cadenas o pares; durante el crecimiento, no constituyen esporas y no son móviles, son anaerobios y anaerobios facultativos, homofermentativos, es decir, forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de la glucosa.^{1,2}

Existen diversos grupos de estreptococos y clasificaciones de acuerdo con sus características y propiedades, el *Streptococcus mutans* pertenece al grupo de *Streptococcus viridans* y se encuentra en el área bucal junto con *Fusobacterium*, espiroquetas, difteroides, cocos gram-negativos, *S. sanguis* y *S. sobrinus* y *S. mitis*. Las características de la

boca permite la colonización debido a su temperatura, humedad y porque constituye una fuente permanente de nutrientes.³

Dentro de la cavidad oral hay diferentes ecosistemas, cada uno con sus bacterias características, por ejemplo, el *S. salivarius* coloniza con preferencia la superficie dorsal de la lengua, el *S. mitis* es el microorganismo predominante en la mucosa bucal, mientras que el *S. sanguis* y el *S. mutans* colonizan los dientes.⁴ Para que ocurra la colonización, los microorganismos forman una delgada película orgánica de varias micras de espesor, como resultado de la fijación de glucoproteínas ácidas de la saliva. Esta película proporciona un sitio adecuado para la fijación de las colonias y el desarrollo de microcolonias bacterianas, esto les permite adherirse firmemente a la superficie y encontrar un nicho protector para evitar ser lavados por el flujo del líquido al cual están sometidos estos sitios. Posteriormente otras bacterias colonizan la placa llegando a predominar organismos filamentosos como *Actinomyces*.⁵

El *S. mutans* es un microorganismo acidogénico y acidúrico que se ha asociado a la caries dental. Desde 1916, Klugeger⁵ mostró que en la placa microbiana había una alta cantidad de cocos gram positivos; en 1924, Clark⁵ aisló estreptococos de lesiones cariosas que fermentaban el manitol y les denominó mutantes porque aparentemente cambiaban a forma oval, a diferencia de los otros estreptococos; en 1986, Loesche introdujo el concepto de *S. mutans* para aquellos estreptococos que fermentan el manitol, el sorbitol y producen glucanos extracelulares a partir de la sacarosa y son cariogénicos.⁶

En este sentido, existen estudios que muestran asociación entre la caries dental y la presencia de *S. mutans* en la placa y saliva.^{7, 8} La presencia y el número de estos microorganismos en la saliva o placa dental, varían con la edad y también con las poblaciones estudiadas.^{9, 10}

El *S. mutans* es más cariogénico si los sujetos de estudio reciben una dieta rica en sacarosa. La capacidad del *S. mutans* para adherirse firmemente a las paredes de los dientes en presencia de sacarosa, es una de las características que se relaciona con su potencial para el desarrollo de la caries.^{11, 12}

El *S. mutans* se puede cuantificar en la saliva, por lo que ha sido utilizado en numerosos estudios para relacionar la prevalencia y la incidencia de caries dental.^{13, 14}

La cantidad de *S. mutans* encontrada en saliva varía considerablemente desde cero hasta 10⁶ Unidades Formadoras de Colonias/ml (UFC/ml), con una concentración promedio aproximada de 10⁵ UFC/ml.¹⁵ El grado de colonización de la cavidad bucal por el *S. mutans* se ha correlacionado por diversos investigadores con la prevalencia de caries dental.¹⁶

Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países del mundo, muestran una asociación entre la presencia del *S. mutans* en la placa dentobacteriana y la prevalencia e incidencia de

caries dental.^{17, 18} No obstante, este microorganismo no es el único que puede causar caries dental, también *S. salivarius* y algunos tipos de actinomicetos son capaces de iniciar lesiones cariosas. No obstante, *S. mutans* es el microorganismo con mayor capacidad para producir este tipo de patología.¹⁹

El propósito del presente trabajo fue estudiar la presencia de *S. mutans* en saliva en dos grupos de escolares de diferentes edades y determinar el grado de infección a través de su análisis bacteriológico, así como estimar la asociación con otros factores como son el consumo de alimentos con gran contenido de azúcares y la higiene oral.

Material y método

Se estudiaron 109 escolares de ambos sexos en una escuela estatal de la delegación Iztacalco en México, D.F. La conformación de la muestra estudiada se realizó mediante muestreo aleatorio simple y estuvo constituida por 57 escolares de seis años de edad y 52 de 11 años de edad. La comunidad de estudio es abastecida con agua potable con concentración de flúor <0.5 ppm.

Ninguno de los niños incluidos estaba bajo tratamiento antibiótico ni lo había recibido en fecha reciente, así como tampoco habían recibido tratamiento odontológico como aplicación de enjuagatorios con fluoruros o uso de clorhexidina.

Se realizó estudio bacteriológico en los niños seleccionados, para ello se tomaron muestras de saliva no estimulada. Los niños depositaron su saliva en tubos de vidrios estériles durante un mínimo de tres minutos, de tal forma que se obtuvieron por lo menos 300 microlitros de saliva.

Se colocó una alícuota de 0.1ml de saliva sin diluir en cada tubo de vidrio con el agar selectivo para el *S. mutans*, en *Mitis Salivarius Agar* (Difco Laboratorios, Detroit MI, USA), al cual se le añadió la bacitracina en una concentración de 0.2U/ml (Sigma St Louis MO, USA) y sacarosa al 20%, *Mitis Salivarius Agar Bacitracina* (MSB). Posteriormente, se empleó la técnica de Matzukubo y colaboradores modificada para determinar el nivel de infección.^{20, 21}

Se colocaron los tubos en una incubadora a 37° C por 24 horas, con una inclinación de 60° con el objetivo de facilitar la adhesión de los microorganismos a las paredes del tubo y después se cuantificó el grado de infección por *S. mutans*; se sacaron los tubos y se procedió a su lectura considerando el número de colonias que se formaron, clasificándose con base en los criterios siguientes:

- 0.- No aparecen colonias en las paredes del tubo.
- 1.- Cuando el número de colonias observadas en el tubo son menos de 10.

- 2.- Cuando el número de colonias observadas en el tubo son más de 10, pero menos de 100.
- 3.- Cuando el número de colonias observadas en el tubo son más de 100, pero menos de 350.
- 4.- Cuando el número de colonias observadas en el tubo son más de 350 y con la apariencia de un cristal nevado.

Con los criterios anteriores se utilizó la correspondencia siguiente catalogándola en niveles que van del 0 al 4: en 0 no existe infección, 1 baja infección, 2 moderada infección, 3 alta infección y 4 muy alta infección. Para fines de este estudio, los niveles 0, 1 y 2 se consideraron como bajos, 3 y 4 como altos.

Esta determinación semicuantitativa de *S. mutans* en la saliva, está fundamentada en la propiedad única de este microorganismo de adherirse y colonizar la superficie del cristal cuando se cultiva en un medio que contiene sacarosa. Además, el medio de cultivo por sus inhibidores es selectivo para *S. mutans*.²² En el presente estudio, se efectuó la tinción de Gram y la prueba de catalasa, manitol y sorbitol, con la finalidad de confirmar las características de los microorganismos desarrollados en los medios de cultivo inoculados con las muestras de saliva de la población de estudio.²³

Se elaboró un cuestionario que se aplicó mediante una entrevista a los padres con el fin de tener la información completa de cada niño. Dicho cuestionario incluía preguntas sobre el consumo de alimentos con alto contenido de azúcar o ingestión frecuente de alimentos chatarra con base en la cantidad utilizada se clasificó el consumo en escaso, regular y elevado. Además, se realizaron preguntas sobre hábitos relacionados con higiene bucal que incluía frecuencia y técnica del cepillado dental.

Con la información obtenida, se elaboró una base de datos y posteriormente fueron procesados mediante métodos estadísticos.

Resultados

Se analizaron los resultados por grupo de edad, donde 57 niños correspondían al grupo de seis años y 52 al grupo de 11 años de edad.

En cuanto al análisis de la cuantificación de *S. mutans* en saliva, los resultados fueron los siguientes: en el grupo de seis años de edad, el grado 0 sin infección se presentó en cuatro niños (7.02%); el grado de infección baja lo presentaron cinco niños (8.77%); el grado de infección moderado, siete niños (12.28%); el grado de infección alta, 19 niños (33.33%) y el de muy alta infección, 22 niños (38.60%). (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución del grado de infección por *S. mutans* en escolares de seis años.

Grado	Número de escolares	Porcentaje
Sin infección (0)	4	7.02%
Baja (1)	5	8.77%
Moderada (2)	7	12.28%
Alta (3)	19	33.33%
Muy alta (4)	22	38.6%
Total	57	100%

En el grupo de edad de 11 años, la cuantificación de *S. mutans* en saliva se presentó de la siguiente forma: sin infección, un (1.92%); el nivel bajo, un niño (1.92%); el moderado, un niño (1.92%); con infección alta, 16 niños (30.77%) y muy alta infección, 33 escolares (63.47%). (Tabla 2).

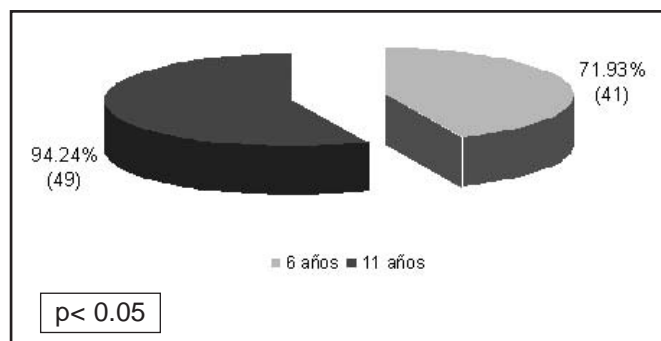
Tabla 2. Distribución de los niveles de infección por *S. mutans* en escolares de 11 años.

Grado	Número de escolares	Porcentaje
Sin infección (0)	1	1.92%
Baja (1)	1	1.92%
Moderada (2)	1	1.92%
Alta (3)	16	30.77%
Muy alta (4)	33	63.47%
Total	52	100%

Al comparar los niveles de infección de alta y muy alta infección (3,4) de los grupos de seis y 11 años, se encontró que el porcentaje de infección es mayor en 22.21% en el grupo de 11 años de edad, $p < 0.05$ (Gráfica 1).

En relación con el consumo de productos azucarados y nivel de infección, se encontró que los niños de seis y de 11 años que tenían un consumo escaso y regular, presentaban un nivel de infección bajo de 0, 1 y 2. Mientras que los que tenían un consumo elevado presentaban un nivel alto de infección en grado de 3 y 4, $p < 0.05$. (Tabla 3).

El 83.8% de los niños de seis y 11 años de edad presentaron defectos en el aseo bucal y en la frecuencia y técnica del cepillado dental.



Gráfica 1. Porcentaje de infección alta (3) y muy alta (4) en niños de seis y 11 años de edad.

Tabla 3. Relación entre el consumo de productos azucarados y nivel de infección.

Grado de Consumo	Niños de seis años	Niños de 11 años	Nivel de infección
Escaso	14	16	0, 1
Regular	31	26	1, 2
Elevado	12	10	3, 4
	Total 57	Total 52	
P < 0.05			

Discusión

Los resultados del estudio confirman que la presencia de *S. mutans* tiene relación con la edad, con el consumo de productos azucarados y con los hábitos higiénico-dietéticos de los niños.²⁴

Los grados y niveles de infección encontrados en la investigación son preocupantes y constituyen un problema importante de salud bucal, sobre todo en los niños de 11 años.

Se encontró una asociación entre la cantidad de dulces que se ingieren y el nivel de infección. Al respecto, los niños de mayor edad consumen más cantidad de productos azucarados, por lo que presentan mayor nivel de infección.^{25, 26} También se detectó una asociación entre el consumo de refrescos y el nivel de infección;^{27, 28} la mayor parte de los dulces y refrescos están endulzados con sacarosa, que es un sustrato que permite el desarrollo del *S. mutans*. Estos carbohidratos provocan una mayor adherencia a las superficies dentales, por lo que es importante en estudios futuros relacionar el consumo de sacarosa, la infección por *S. mutans* y la caries dental.^{29, 30}

En 1996, México ocupaba el segundo lugar como consumidor mundial de refrescos, superado sólo por Estados Unidos. Las compañías internacionales que acaparaban 80% del mercado nacional eran Coca-Cola, Fanta, Sprite, Pepsi Cola, Mirinda y Seven Up.^{31, 32}

El papel que juegan los azúcares en la caries dental y en la formación de la placa dentobacteriana está condicionado por la frecuencia en el consumo de los carbohidratos y las características fisicoquímicas de los alimentos que lo contienen.^{33, 34, 35} El consumo de estos productos se debe a diferentes factores entre los que se encuentran: la incesante publicidad, la facilidad con que se adquiere el producto en cualquier tienda y la comodidad de comprar un producto ya elaborado. En este sentido, el consumo de estos productos desplaza el de otros alimentos de mayor valor nutritivo.²⁷

En un estudio de cariogenicidad de los alimentos, se encontró que cuando se restringen los productos con sacarosa disminuye importantemente la caries.³⁶

En relación con la edad se encontró que los niños de 11 años presentan 22.21% más infección sobre todo en los niveles 3 y 4, esto como ya se comentó se debe a que los de mayor edad consumen más carbohidratos, pero además influye que se han expuesto más tiempo a los factores de riesgo.³³

El nivel de infección por *S. mutans* en nuestro estudio es alto comparado con los reportados por otros autores, pero en esas investigaciones el consumo de productos azucarados de la población infantil era inferior al encontrado por nosotros. En el estado de México, se realizó un trabajo en escolares de 12 años, con resultados similares a los nuestros, incluso en niveles mayores con respecto al grado 4, esto seguramente se debe que a mayor edad más consumo de azúcares especialmente en bebidas.^{37, 38}

Se deben implementar medidas de prevención en edades tempranas de la vida, estableciendo sistemas de información para los niños sobre dieta, higiene bucal y utilización de fluoruros.³⁹ En las poblaciones que presentan niveles de infección alto y muy alto, la medida más eficaz es la utilización de clorhexidina.⁴⁰

La clorhexidina tiene un amplio espectro microbiano, es bactericida y eficaz; es considerado el agente de elección para disminuir el número de microorganismos cariogénicos.⁴¹ Se recomienda enjuagues con 10 ml de solución de clorhexidina al 0.2%, los que provocan una reducción de 80% a 90% en los niveles de estos microorganismos.⁴² Hennessey reportó que los microorganismos gram positivos son más sensibles que los negativos a la clorhexidina y que los estreptococos fueron los más afectados.⁴³

Conclusiones

El grado de infección por *S. mutans* es preocupante, ya que es muy elevado en ambos grupos de edad, y más todavía en los niños de 11 años que están más expuestos a factores de riesgo, por lo

que es urgente establecer programas preventivos que incluyan sobre todo medidas higiénicas relacionadas con la frecuencia y las técnicas de cepillado dental; a esto se le deben sumar acciones en el primer nivel de atención a la salud al promover hábitos alimentarios correctos para que la población afectada consuma alimentos con alto valor nutricional y disminuya la ingesta de alimentos chatarra. En este proceso es necesario incluir a padres de familia, maestros y profesionales relacionados con la atención a la salud.

Referencias

1. Jawetz MA. Microbiología médica. 15ª ed. México El Manual Moderno. 1996.
2. Mouton C, Robert JC. *Bacteriología bucal*. 3ª. Ed. Barcelona Masson 1995; 97-8.
3. Liébana UJ. Microbiología Oral. México Interamericana Mc.Graw Hill 1997;228.
4. Burnett G. Manual de microbiología y enfermedades infecciosas de la boca. 1988.
5. Hamada S, Slade H. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:2:331-84.
6. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
7. Krasse B, Jordan HV, Edwardsson S. *et al*. The occurrence of certain caries inducing streptococci in human dental plaque material. *Arch Oral Biol* 1968;13:911-8.
8. Schamschula RG, Charlton GA. A study of caries etiology in New South Wales schoolchildren. I. The streptococcal flora of plaque and caries prevalence. *Aust Dent J* 1971;16:77-82.
9. Fujiwara T, Sasada E, Mina N. *et al*. Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2 year-old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:151-154.
10. Kohler B, Peterson B M, Brathall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. *Scand J Dent Res* 1981;89:19-25.
11. Chosack A, Cleaton-Jones P, Woods A. *et al*. Caries prevalence and severity in the primary dentition and *Streptococcus mutans* levels in the saliva of preschool-children in South Africa. *Community Dent Oral Epidemiol* 1988;16:289-291.
12. Carlsson P. Distribution of mutans streptococci in populations with different levels of sugar consumption. *Scand J Dent Res* 1989;97:120-125.
13. Pettis TE, Satto R, Ottolenghi TL, Simonetti DA. Su tre different, methodiche di valutazione dello streptococcus mutans nella saliva. *Minerva Stomatol* 1994;43:3:98-101.
14. O'Sullivan DM, Thibodean EA. Caries experience and mutans *Streptococci* as indicators of caries incidence. *Pediatr Dent* 1996;18:5:371-4.
15. Mohan, D. E. Morse, D.M. O'Sullivan, N. Tinanoff, The relationship between bottle usage/content, age, and, number of teeth with *mutans streptococci* colonization in 6-24-month-old children. *Community Dent and Oral Epidemiol* 1998;26:12-20.
16. Canfield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Inicial acquisition of *mutans streptococci* by infants; evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1998;77(10):1851-5.
17. M.M.E. Straetemans, C. van Loveren, J.J. de Soet, J. De Graaff, J.M. Ten Cate; Colonization with Mutans Streptococci and Lactobacilli and Caries Experience of children after the age of five. *J Dent Res* 1998;77(10):1851-5.
18. Thylstrup A y Fejerskov O. Caries. Ediciones Doyma SA Barcelona España 1988.
19. Campos CE. Etiología de la caries, estreptococo mutans, capacidad buffer salival y tipo de dieta. *ADM* 1985; 43-50.
20. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973;18:1357-1364.
21. Matzukubo T. *et al*. A semi-quantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium. *Caries Res* 1981;15:40.
22. Emilson CG. Prevalence of *Streptococcus mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. *J Dent Res* 1983;91:26-32.
23. Mac Faddin Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. México 1993.
24. Gordon Y, Reddy J. Prevalence of dental caries, patterns of sugar consumption and oral hygiene practices in infancy in S Africa. *Community Dent Oral Epidemiol* 1985;310-4.
25. Los mexicanos y los refrescos. Revista del Consumidor 2002;304:6:6.
26. Aguzzi Alejandra, Batrouni Lucía, Dorronzoro Susana. Patrones de consumo de carbohidratos en niños de tres años de edad. Estudio CLACYD, Córdoba Argentina. *Práct Odontol* 1998;20:6:6-16.
27. Los capitalinos y los refrescos:¿cuántos, por qué? *Revista del Consumidor* 1985;3:18-20.
28. Refrescos ¡Un consumo muy inflado! *Revista del Consumidor PRO-FECO* 1996; 234:8:15-17.
29. Amadottir IB, Rozier RG, Saemundsson SR *et al*: A proximal caries and sugar consumption in Icelandic teenagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26:115-21.
30. Kashket S, Zhang J, Van Houte J: Accumulation of fermentable sugars and metabolic acids in food particles that become entrapped on the dentition. *J Dent Res* 1996;11(75):1885-1891.
31. Ismael AI, Tanzer JM, Dingle JL. Current trends of sugar consumption in developing societies. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25:438-43.
32. Ismael AI, Burt BA, Eklund SA: The cariogenicity of soft drinks in the United States. *J Am Dent Assoc* 1984; 109:241-5.
33. Refrescos: un gasto riesgoso. Revista del Consumidor 1989; 152:(10):17-9.
34. Rodríguez LE, Rabasa GR, Méndez VR. Relación entre el consumo de productos chatarra y prevalencia de caries dental. *Práct Odontol* 1995;16(3):37-42.
35. Szpunar SM, Eklund SA, Burt BA. Sugar consumption and caries risk in schoolchildren with low caries experience. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995;23:142-6.
36. Ismael AI: Food cariogenicity in Americans aged from 9 to 29 years assessed in a national cross-sectional survey. *J Dent Res* 1986;65:1435-40.
37. Sánchez F, Nava RJ. Niveles de infección de *Streptococcus mutans* y caries dental en un grupo de niños de 12 años de edad. *Práct Odontol* 1995;17:3:6-9.
38. Molina Frechero N, Irigoyen Camacho M. Detección de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en población escolar de la Ciudad de México *Práct Odontol* 1996;17:8:19-24.
39. Nourja P, Horowitz a y Wagener D: factors associated with the use of fluoride supplements and fluoride dentifrice by infants and toddlers. *J Public Health Dent* 1994;54(1):47-54.
40. Maltz M, Zickert I, Krasse B. Effects of intensive treatments with chlorhexidine on the number of streptococcus mutans in saliva. *Scand J Dent Res* 1981;89:449-455.
41. Sandham HJ, Brown HI and Chan KH A preliminary report of long-term elimination of detectable Streptococci in man *J Dent Res* 1988;67:1:9-14.
42. Schiott CR The effects of clorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 1970;5:84-8.
43. Hennessey TD Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1973;8:61-6.