

Article original

Caractérisation phénotypique des espèces de Streptococcus impliquées dans les caries dentaires et évaluation de l'activité antimicrobienne de deux ciments verres ionomères à Oran

Phenotypic characterization of Streptococcus species involved in dental caries and evaluation of the antimicrobial activity of two glass ionomer cements in Oran.

Farah Chahrazad BELMABROUK 1, Ghenima GRICHE 1, Yassamine MAMERI 1, Mebrouk KIHAL 2, Sid Ahmed SERRADJ 1

1 Laboratoire de recherche en Odontologie Conservatrice/Endodontie. Département de Médecine Dentaire, Faculté de Médecine. Université Oran1, 2 Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Oran1

Auteur correspondant: drbelmabrouk.ch@hotmail.fr Soumis le 25/01/2021 ; accepté le 05/05/2021 ; publié le 25/06/2021

Citation: BELMABROUK, F-C., et al. Caractérisation phénotypique des espèces de Streptococcus impliquées dans les caries dentaires et évaluation de l'activité antimicrobienne de deux ciments verres ionomères à Oran. (2021) J Fac Med Or 5(1):641-652.

DOI : <https://doi.org/10.51782/jfmo.v5i1.116>

MOTS CLÉS

Les ciments verres ionomères, action antibactérienne, carie récurrente, antibiogramme, Streptococcus mutans.

Résumé

Introduction-Objectif-Les ciments verres ionomères (CVI) sont des polyacrylates complexes ou polyalkénoates de verres composés de verres basiques et d'un polymère acide. Des modifications considérables ont été apportées aux formulations et aux propriétés de manipulation des CVI pour différentes applications cliniques, d'où l'invention de plusieurs types de CVI. La microflore buccale est très hétérogène par sa qualité et sa quantité. L'objectif de cette étude a été d'isoler et d'identifier les bactéries impliquées dans les caries dentaires et de comparer l'effet de deux types de ciments verres ionomères sur la croissance de ces germes.

Matériels et méthodes -Des méthodes microbiologiques, physiologiques et biochimiques ont été utilisées pour l'isolement et l'identification des bactéries isolées des malades souffrant de caries dentaires. Ces bactéries ont été utilisées pour évaluer l'effet du ciment verre ionomère. L'activité du CVI a été évaluée par la méthode de diffusion.

Résultats -Les résultats obtenus ont permis de montrer que les bactéries impliquées dans les caries dentaires appartenaient aux espèces de Streptococcus (St) mutans (28,6 %). Les espèces de St.suis (28,6%), St. porcinus (14,3%) avec St. bovis (14,3%) et Aerococcus viridans (14,2%) étaient également présentes, provoquant une activité hémolytique. Le test de la sensibilité aux antibiotiques révèle que les espèces de St. Mutans sont les plus sensibles. Les deux types de CVI (CVIc, CVIMAR) ont produit un effet bactéricide sur les St. mutans. Il n'existe pas de différence significative de l'effet antibactérien entre le CVIc et le CVIMAR sur les St. mutans.

Conclusion -L'utilisation des CVI ou des CVIMAR en tant que matériaux de restaurations dentaires, pour prévenir ou du moins limiter l'extension des caries résiduelles et récurrentes, mérite d'être reconsidérée par les praticiens. Ils devraient être largement recommandés en pratique quotidienne, particulièrement chez les patients présentant un risque carieux élevé.

KEY WORDS

Glass ionomer cements, antibacterial action, recurrent caries, anti-biogram, Streptococcus mutans.

Abstract

Introduction-Objective-Glass ionomer cements (CVI) are complex polyacrylates or polyalkenoates of glasses composed of basic glasses and an acidic polymer. Considerable changes have been made in the formulations and handling properties of CVIs for different clinical applications, resulting in the invention of several types of CVI. The oral microflora is very heterogeneous in quality and quantity. Some germs are helpful and protect the oral cavity, but there are others that are pathogenic. The aim of this study was to isolate and to identify the bacteria involved in dental caries and compared the effect of two types of glass ionomer cements on the growth of these germs.

Material and methods - Microbiological, physiological and biochemical methods were used for the isolation and identification of bacteria isolated from patients suffering from dental caries. These bacteria were used to assess the effect of glass ionomer cement. CVI activity was performed by the semi-solid medium diffusion method.

Results -The results obtained have shown that the bacteria involved in dental caries belonged to the species of *Streptococcus mutans* (28.6%). The species of *St. suis* (28.6%), *St. porcinus* (14.3%) with *St. bovis* (14.3%) and *Aerococcus viridans* (14.2%) were also present, causing hemolytic activity. The antibiotic sensitivity test reveals that the species of *St. mutans* are the most sensitive. The two types of CVI (CVIc, CVIMAR) studied produced a bactericidal effect on *St. mutans*. There is no significant difference in the antibacterial effect between CVIc and CVIMAR on *St. mutans*.

Conclusion - The use of CVI or CVIMAR as dental restorative materials, to prevent or at least limit the spread of residual and recurrent caries, deserves to be considered by practitioners. They should be widely recommended in daily practice, particularly in patients with high caries risk.

1. Introduction

La flore microbienne buccale humaine constitue un biofilm très diversifié. 25 espèces de streptocoques buccaux colonisent la cavité buccale humaine et représentant environ 20 % de la microflore buccale [1]. La classification des streptocoques évolue rapidement et elle reste provisoire [1, 2]. Les espèces de streptocoques buccaux développent des propriétés spécifiques et s'adaptent à l'écosystème buccal. Les déséquilibres dans la flore indigène sont la cause de maladies buccales et sous des conditions propices, des streptocoques peuvent devenir des pathogènes initiateurs de maladies et de dommages chez l'humain. Le groupe des *St. Mutans* est impliqué dans l'initiation des lésions carieuses et la formation de la carie dentaire [1, 3].

Les espèces *St. mutans* et *St. sobrinus* joueraient un rôle prédominant dans la formation des caries dentaires et ont aussi été associées aux endocardites et autres infections du cœur [4]. *St. mutans* est rapporté comme étant principalement associé aux caries coronaires, tandis que *St. sobrinus* est plutôt associé aux caries des surfaces lisses [5]. Les espèces du groupe mitis telles que *St. sanguinis* et *St.*

oralis sont les plus communément responsables des endocardites [6, 7]. Les procédures thérapeutiques utilisées dans le traitement des caries n'éliminent pas toujours tous les micro-organismes des tissus résiduels. La présence bactérienne persistante, ainsi que l'absence d'un joint parfaitement hermétique entre la restauration dentaire et les parois de la cavité, permettant ainsi une fuite bactérienne, peuvent être impliquées dans le développement des caries récurrentes. Afin de prévenir ou de ralentir la progression des lésions et, par conséquent, de réduire le taux de remplacement de la restauration, il existe un intérêt croissant pour de nouveaux matériaux dentaires capables d'attirer moins de biofilm ou de libérer des composés antimicrobiens [4, 8].

L'activité carieuse du patient et le type de cavité sont des facteurs importants lorsque le praticien choisit le matériau de restauration. Si l'activité carieuse est élevée et / ou si l'objectif est la prévention carieuse, le ciment verre ionomère « CVI » reste le premier choix. L'action antibactérienne et la reminéralisation en rapport avec le fluor libéré en continu par les CVI peuvent être prédites. Ces effets ont été confirmés par des études de laboratoire [9], des essais cliniques [10, 11] et des expériences sur le terrain [3]. [3]. L'objectif principal de cette étude a été d'isoler des souches

de Streptocoques mutans à partir de patients atteints de caries dentaires dans la région d'Oran-Algérie, ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne de deux ciments verres ionomères, CVI conventionnel (CVIc) et CVI modifié par adjonction de résine (CVIMAR), sur la croissance des souches indigènes de St. mutans.

2. Matériels et méthodes

Il s'agit d'une étude expérimentale (*in vitro*) quantitative et qualitative de l'action antibactérienne de deux ciments verres ionomères sur les streptocoques mutans, qui s'est déroulée en une année d'Octobre 2019 à Octobre 2020.

2.1. Echantillonnage et prélèvement

Les prélèvements des tissus cariés amélo-dentaires ont été réalisés sur 9 patients différents qui répondaient aux critères d'inclusion suivants: des dents permanentes matures ne présentant aucune atteinte parodontale associée, chez des sujets âgés de 20 à 50 ans en moyenne ne présentant aucune pathologie d'ordre général, n'ayant pas bénéficié d'une application de fluor dans les 48H qui précédaient le prélèvement et/ou n'ayant pas pris des antibiotiques dans les 03 derniers mois. Les prélèvements ont été effectués au niveau du service d'Odontologie Conservatrice/Endodontie du CHU d'Oran. Deux séances de prélèvement ont été effectuées : la première séance a été réalisée sur 5 patients codifiés de A à E et présentant des dents cariées de différents sites de localisation et stades d'évolution. Chaque prélèvement a été effectué en profondeur en utilisant un excavateur stérile et bien affuté. La deuxième séance de prélèvements a concerné 4 patients codifiés de F à I, cette fois-ci, le prélèvement de la dentine ramollie était fait en surface. Chaque tissu carié prélevé est mis directement dans un tube contenant un milieu de transport liquide à base d'une solution tampon phosphate (PBS).

2.2. Etude microbiologique

Isolement des souches de Streptococcus

A partir de la suspension mère, ont été préparées des dilutions décimales allant de 10⁻¹ à 10⁻⁵ dans des tubes à essai contenant 9ml de solution physiologique préalablement préparée (9g de NaCl/L d'eau distillée), à l'aide d'une pipette stérile, et dans des conditions d'asepsie (À proximité de la flamme d'un bec bunsen). Les milieux de culture collectifs ou sélectifs ont été ensemencés par 0,1 ml de la suspension de dilution étalée dans des boîtes de pétri contenant le milieu Roth solide. Les cultures en boîtes ont été incubées en

anaérobiose à 37°C pendant 5 jours en utilisant une jarre et une bougie pour absorber l'oxygène [12, 13].

L'obtention de colonies bien isolées facilite leur choix et permet de réaliser une purification par épuisement sur milieu Roth solide. Cette purification est contrôlée par une observation microscopique pour déterminer l'aspect cellulaire et le mode d'association ainsi que le type de la coloration de gram. La croissance des isolats sur milieu sélectif de Listky et l'éventuelle formation d'une pastille violette, confirment l'appartenance des souches à la famille des Streptococaceae.

Identification des Streptococcus

L'identification des souches bactériennes a été effectuée conformément aux critères de Holt et al., (1994) [14] qui sont, l'aspect morphologique, macroscopique et microscopique des isolats, les tests physiologiques et biochimiques, le test de la catalase, les galeries API 20 Strep miniaturisées et le test de sensibilité aux antibiotiques.

Les tests spécifiques

Le test de l'hémolyse est considéré comme une étape incontournable pour différencier les Streptococcus pathogènes des autres Streptococcus ssp. commensales. Le test permettra de déterminer le type d'hémolyse auquel appartient la bactérie étudiée [12]. Ce test s'effectue par ensemencement des bactéries sur milieu gélose au sang frais et après incubation à 37°C pendant 24h, les colonies produisant différentes zones de lyses classent les bactéries en trois groupes, selon le type d'hémolyse α , β et λ [12, 13]. L'observation après 24H d'incubation a révélé une absence d'hémolyse sur la gélose au sang. En revanche, l'observation après 72H d'incubation a montré l'apparition d'hémolyse de diamètre variable autour des différentes colonies bactériennes étalées sur la gélose au sang F1, F2, G1, G2, G3, H, I.

Culture en milieu spécifique (MITIS-SALIVARUS) modifié

Les isolats produisant une zone d'hémolyse type β ont été retenus pour tester le milieu spécifique MITIS-SALIVARUS (MS). Ce milieu a été légèrement modifié par l'addition de mannitol comme source de carbone et de sulfate de kanamycine comme agent inhibiteur des autres espèces de Streptococcus. La réalisation des prélèvements à partir des souches mères (échantillons F2, G1 et G3) cultivées sur la gélose au sang modifiée correspondantes aux St. mutans, et ensemencés sur le milieu MS modifié puis incubation à 37°C pendant 24h [7, 15, 16]. La réaction s'est manifestée par un changement de couleur du milieu, du violet vers le jaune-verdâtre avec un développement des souches cultivées autres que les St. mutans.

Utilisation des glucides

La première technique est l'utilisation de la galerie API 20 Strep qui comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres [12]. Les tests enzymatiques ont été inoculés avec une suspension bactérienne dense, réalisée à partir d'une culture pure fraîche, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se sont traduites par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres. La fermentation carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré (AP 20 Strep 2007). La seconde technique a été, l'utilisation d'un milieu spécifique aux *St. mutans* (MST modifié) [13] en changeant le glucide incorporé dans le milieu de culture. La fermentation du sucre par la bactérie s'est traduite par le virement de la couleur de l'indicateur. Ce test permettra de confirmer les résultats de la galerie API Strep, mais aussi d'appuyer l'identification des espèces de *St. mutans*. Les glucides utilisés étaient : mannitol, amidon, sorbitol, glucose, rhamnose, raffinose, xylose, tréhalose.

Test d'antibiogramme

Le test de sensibilité des isolats aux antibiotiques est un critère ultime d'identification des souches bactériennes anaérobies. Les isolats (F2, G1 et G3) ont subi donc, des tests de confirmation des résultats de la galerie biochimique en vérifiant leur croissance en présence des antibiotiques suivants : Amoxicilline (25µg), amoxicilline associée à l'acide clavulanique (30µg), vancomycine (5µg), Ampicilline (1mg), Céfotaxime (0,5 mg), et Pénicilline G (6µg) [17]. La lecture selon le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA- SFM, 2005) : la souche bactérienne peut être définie comme sensible (S), intermédiaire (I), ou résistante (R). A partir de la suspension bactérienne fraîche, un ensemencement est effectué par épuisement sur le milieu semi solide de Mueller Hinton pré coulé dans une boîte de pétri. Les disques d'antibiotiques ont été aseptiquement déposés sur la gélose ensemencée, ensuite les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48h. L'observation après 48h permet de détecter les zones d'inhibition transparentes autour des disques si la souche est sensible et l'absence de zone indique la résistance de la souche à l'antibiotique [12,18, 19].

Evaluation de l'action antibactérienne des CVI

Nous avons étudié et comparé l'effet antibactérien de deux types de CVI chétopolymérisables : ciment verre ionomère conventionnel CVIc (Ionover Filling, Teinte universelle C1,

Ref : 10390, Produit dentaires SA, Made in Switzerland.) et ciment verre ionomère modifié par adjonction de résine CVI-MAR (i-FIX Plus, REF : IIXPP, LOT : 180614, Made in Lithuania).

Préparation du CVIc chétopolymérisable

La poudre est d'abord secouée avant d'en déposer une certaine quantité sur une plaque à malaxer en verre. Les quantités sont strictement respectées: Une goutte de liquide pour une mesure de poudre (Selon les recommandations du fabricant). Le liquide est ajouté à l'aide d'un compte-gouttes. La poudre est mélangée avec le liquide en incorporant ce dernier progressivement. Ensuite le mélange est malaxé avec une spatule résistante à l'abrasion. Le temps de mélange est moins d'une minute et le temps de travail est d'environ 2 minutes à température ambiante (15°C à 23°C). Le temps de prise peut atteindre 2 à 3 minutes [20].

Préparation du CVIMAR chétopolymérisable

Selon les recommandations du fabricant, la préparation de ce ciment verre ionomère par adjonction de résine est réalisée par le malaxage d'une cuillère de poudre avec 03 gouttes de liquide. La durée de malaxage est de 30 secondes. Le temps de travail est de 2 minutes incluant le malaxage. Le temps de prise est de 6 minutes à compter du début de la préparation [20].

Conditionnement du matériau en disques

Avant la prise des deux matériaux, des embouts stériles sont utilisés comme emportes pièces, afin d'obtenir des disques identiques de 0,06g chacun.

Mise en contact des CVI avec les Streptococcus mutans

En suivant le même principe que l'antibiogramme, les disques de CVI et CVIMAR sont déposés aseptiquement sur la gélose semi solide de Mueller Hinton préalablement ensemencée par les souches pures indigènes de *St. mutans*. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h. Après incubation, l'apparition de zones claires d'inhibition autour des disques ont été observées. L'évaluation de l'action antibactérienne des CVI testés est réalisée par la mesure du diamètre du cercle formé autour de chaque disque.

Mode d'action antibactérienne des CVI

Afin de bien préciser l'action antibactérienne des CVI sur les souches de *St. mutans*, nous avons effectué un prélèvement des bactéries de l'intérieur des zones d'inhibition qui se sont formées sous l'action des deux produits afin de les cultiver

dans des conditions favorables aux souches correspondantes [17,21]. Après incubation, lorsqu'une croissance bactérienne est observée, on parle d'une action bactériostatique, dans le cas contraire, le mode d'action est bactéricide.

Analyse statistique

Le test « T de Student » a été utilisé pour la comparaison en premier lieu, entre les valeurs moyennes des rayons de CVI et CVIMAR pour les 7 types de bactéries obtenues, et en deuxième lieu entre les valeurs moyennes des rayons de CVI et CVIMAR pour les St. mutans uniquement [22], avec une signification $p < 0,05$. L'analyse a été effectuée à l'aide du logiciel « SPSS version 20 ».

3. Résultats

Résultats de l'isolation

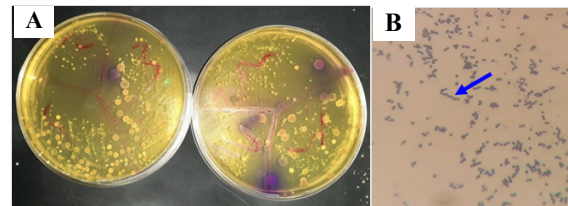
La croissance bactérienne sur milieu Roth et Litsky des échantillons prélevés en profondeur lors de la première séance, n'ont abouti à aucune identification microscopique de forme bactérienne « cocci en chainettes », et ce dans les 5 prélèvements (A, B, C, D, E). La lecture microscopique était dominée par la présence de bactéries en bâtonnets et des cocci isolés.

En revanche, dans les prélèvements effectués en surface des lésions carieuses, des colonies lenticulaires de couleur blanchâtre ont été observées et l'examen microscopique montre des formes cellulaires en cocci associés en chainettes correspondant au groupe des streptocoques dans les échantillons F1, F2, G1, G2, G3, H et I.

Après purification des isolats des seconds prélèvements, toutes les colonies étaient formées de cellules en cocci gram positif. Le test de la catalase était négatif et les colonies étaient immobiles pour tous les isolats. Cependant, des cocci Gram positif associés en chainettes ont été identifiés exclusivement dans les échantillons F2 et G1 bien exploitables au microscope optique, c'est l'aspect caractéristique des St. mutans.

Le milieu de culture MS modifié par l'addition de mannitol et de kanamycine a permis de sélectionner les espèces de St. mutans qui ont produit des colonies de couleur jaune indiquant la fermentation du mannitol et leur résistance à la kanamycine (Fig.1). Ces caractères de St. mutans ont déjà été observés [3, 9, 15,16].

Figure 1. Développement des colonies (A) sur milieu MS modifié et virage du violet vers le jaune verdâtre indiquant l'utilisation des sucres et la résistance à l'agent inhibiteur kanamycine. Aspect cellulaire des isolats (B), (barre :10µm)



Résultats du test d'hémolyse

Le test de l'hémolyse permet une sélection des isolats possédant ce caractère qui correspond à un facteur de virulence chez les espèces microbiennes pathogènes. Les isolats de surface ont montré une activité hémolytique intéressante ce qui oriente l'identification vers les espèces de St. mutans. Le tableau 1 et la figure 2, mentionnent les résultats du test d'hémolyse pour tous les échantillons.

Tableau 1: Le test d'hémolyse des différents échantillons.

Prélèvements en surface	
Echantillon	Type d'hémolyse
F	F1 et F2 β -hémolyse
G	G1 et G3 β -hémolyse
G	G2 α -hémolyse
H	H β -hémolyse
I	I α -hémolyse

Figure 2 : Observation de l'hémolyse après 72h d'incubation pour les isolats F1, F2, G1, G2, G3, H, I



Fermentation des carbohydrates API20 Strep

L'analyse des résultats de la fermentation des sucres réalisée par la galerie API 20 Strep a permis d'identifier les espèces suivantes : *Aerococcus viridans* (F1), *St. mutans* (F2 et G1), *St. porcinus* (G2), *St. bovis* (G3) et *St. suis* (H et I). Les espèces de *St. mutans* représentent 28% de l'ensemble des *Streptococcus* isolés. L'étude de la fermentation des sucres a été réalisée sur trois isolats F2, G1 et G3 qui ont produit une zone d'hémolyse β sur gélose au sang frais. Les résultats du test biochimique à la galerie API20 Strep pour tous les cocci Gram positif, de catalase négative et de type hémolyse α ou β sont représentés dans le tableau 2. Le résultat de la fermentation des glucides confirme l'appartenance des souches F2 et G1 à l'espèce de *St. mutans*.

ont utilisé le mannitol pour élaborer un milieu sélectif pour *St. mutans*. Dans l'échantillon F nous avons identifié l'isolat F1 comme *Aerococcus viridans*, dans l'échantillon G, l'isolat G2 comme *St. bovis* qui produit une hémolyse β et dans les échantillons H et I, les deux isolats appartiennent aux *St. suis*. Ces dernières souches utilisent l'amidon et le glycogène et ne produisent pas d'acétoïne (Tab. 2).

Antibiogramme

Les résultats du calcul des rayons des auréoles formées autour des disques d'antibiotique (Fig.3) exprimés en cm, sont enregistrés dans le tableau 3.

Tableau 2. Les espèces de *Streptococcus* identifiées par les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques et par galerie API 20 Strep des différents échantillons.

Caractères \ Isolats	1(F1)	2(F2)	3(G1)	4(G2)	5(G3)	6(H)	7(I)
Forme cellulaire	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Mode d'association	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette	Chainette
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Mobilité	-	-	-	--	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Type respiratoire	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
Type hémolyse	β	β	β	α	β	α	α
Voges proskauer	\pm	+	+	+	+	-	-
Acide hippurique	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydro-lase	-	-	-	+	-	+	+
D-ribose	+	\pm	\pm	\pm	-	-	-
L-arabinose	+	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	-	-	-
D-sorbitol	-	+	+	+	-	-	-
D-lactose	+	+	+	+	+	+	+
D-tréhalose	+	+	+	+	+	+	+
inuline	-	\pm	\pm	-	-	\pm	\pm
D-raffinose	\pm	+	+	-	+	+	+
Amidon	+	-	-	\pm	\pm	+	+
Glycogène	\pm	-	-	-	-	+	+

Nous observons que les sucres glucose, tréhalose, raffinose, mannitol, sorbitol, lactose, ont été fermentés par les *St. mutans*(F2, G1). En revanche, pour les pentoses aucune fermentation claire n'a été observée. Certains auteurs [3,13,16,23]

Nous remarquons que les *St. mutans* sont sensibles aux antibiotiques testés excepté pour l'ampicilline où ils sont définis comme intermédiaires. En revanche, G3 qui est *St. bovis* résiste relativement mieux aux antibiotiques comparé au *St. mutans*.

Figure 3-Action des antibiotiques sur la croissance de la souche de St. mutans F2 et l'apparition des zones d'inhibition autour du disque. (La flèche indique la zone d'inhibition)

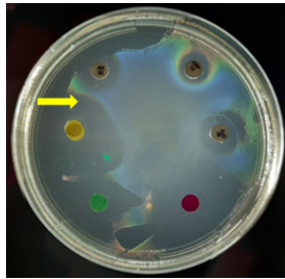


Tableau 3-Les valeurs des zones d'inhibition (rayons de cercles formés) autour de chaque disque d'antibiotique.

Souche	AMC	AMX	VA	AMP	PNG	CFX
F2	S(1,5)*	S(1,6)*	S(2,8)*	I(01)*	S(3,3)*	S(1,4)*
G1	S(1,6)	S(1,6)	S(2,8)	I(01)	S(3,2)	S(1,8)
G3	I(01)	I(01)	S(3,2c)	I(01)	S(3,2)	S((1,4)

*CM, AMC= Amoxicilline+ Acide clavulanique, AMX =Amoxicilline, VA =Vancomycine, AMP= Ampicilline, PNG =Pénicilline G, CFX =Céfotaxime.
S = Sensible, R = Résistante et I= Intermédiaire

Evaluation de l'action antimicrobienne des CVI

Le CVIc et le CVIMAR ont montré un effet antibactérien sur les St. mutans. Cet effet est cependant variable sur les autres streptocoques isolés. Le résultat de calcul des diamètres d'action exprimés en cm est représenté dans le tableau 4 et la figure 4.

L'analyse des résultats de l'action de CVI et CVIMAR sur l'inhibition des isolats de Streptococcus montrent que les espèces de St. mutans sont très sensibles par rapport aux autres espèces. En effet, les espèces de St. suis sont les plus résistantes aux CVI et CVIMAR. Une action intermédiaire a été observée pour St. porcinus.

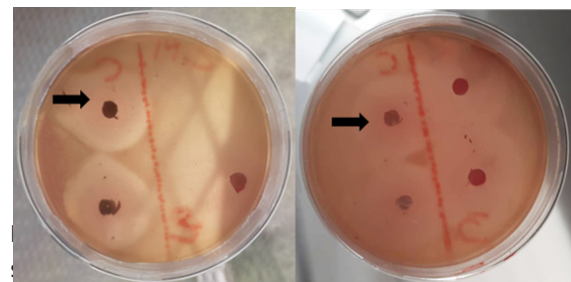
Mode d'action antibactérienne des CVI

Il a été constaté à partir des résultats d'incubation des St. mutans prélevés de l'intérieur du cercle d'inhibition, qui représente le périmètre d'action des CVIc et CVIMAR sur ce type de bactéries, que les stries réalisées lors de l'ensemencement de la gélose sont restées transparentes, cela témoigne de l'absence de toute multiplication bactérienne des St. mutans.

Tableau 4-Effet antibactérien des CVIc et CVIMAR sur les espèces de Streptococcus étudiées.

Echantillon	CVI	CVIMAR
F1 Aerococcusviridans	0.1cm	0 cm
F2 Streptococcus mutans1	2.8 cm	2 cm
G1 Streptococcus mutans2	2.6 cm	3 cm
G2 Streptococcus porcinus1	0.6 cm	1.2 cm
G3 Streptococcus bovis	0.1cm	0 cm
H Streptococcus suis1	0 cm	0 cm
I Streptococcus suis2	0 cm	0.2 cm

Figure 4: L'effet inhibiteur des CVIc (à gauche) et CVIMAR (à droite) sur les souches G1 et F2 de St. mutans. (La flèche indique la zone d'inhibition)



En outre, St. porcinus a montré une croissance remarquable indiquant l'effet bactériostatique. En revanche, Aerococcus viridans et St. suis sont des souches résistantes aux deux types de CVI. Nous avons constaté que les stries d'ensemencement sur la gélose nutritive sont devenues opaques, indiquant l'existence d'une forte croissance bactérienne. Dans ce cas, les deux CVI ont un effet bactériostatique sur les autres Streptocoques identifiés.

L'analyse des données du Test-T-student en comparant la moyenne des rayons de CVIc et CVIMAR testés sur tous les streptocoques isolés, a indiqué une valeur de P=0,966, donc l'hypothèse nulle, qui stipule qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes testés, est acceptée. Nous avons conclu qu'il n'y a pas une différence significative dans l'effet antibactérien des CVIc et CVIMAR sur tous les streptocoques.

L'analyse des données par le Test-T-student en comparant la moyenne des rayons de CVIc et CVIMAR testés sur les St. mutans uniquement, indique qu'il n'y a pas de différence significative dans l'effet antibactérien des CVIc et CVIMAR ($P=0,758$).

Discussion

L'objectif principal de chaque traitement de la lésion carieuse est de, soit préserver ou de restaurer la fonction de l'organe dentaire en arrêtant le processus de la maladie elle-même, soit empêcher sa récurrence. Le but principal de son traitement est l'élimination des tissus carieux.

La récurrence des caries peut être causée par des micro-infiltrations permettant aux micro-organismes de pénétrer dans l'espace entre la dent et l'obturation coronaire [24]. Les résultats des études cliniques et de laboratoire indiquent que le risque de récurrence de carie est cliniquement insignifiant si le nombre de bactéries laissées dans la cavité après éviction carieuse est inférieur à 102CFU/ml, à condition que l'obturation soit correctement scellée [25, 26].

Banerjee et Watson [25] recommandent d'utiliser des matériaux de restauration qui assurent une étanchéité à long terme et une activité antibactérienne contre les souches cariogènes. De même pour Hugar et Assudani [27] qui proposent une méthode pour réduire la fréquence et la gravité de ce problème par l'utilisation de matériaux de restauration contenant du fluorure. Les ciments verres ionomères ont prouvé une activité antibactérienne contre les espèces St. mutans, St. oralis, St. salivarius et les autres espèces de Streptococcus. L'expérience clinique a indiqué que très peu ou pas de lésions carieuses secondaires sont observées autour des restaurations en verre ionomère [27].

Nous avons pu identifier dans notre étude la présence des espèces de Streptocoques dans les tissus cariés prélevés, et nous avons remarqué que les Streptocoques étaient présents uniquement dans les échantillons prélevés dans les cavités carieuses peu profondes. En revanche, dans les cavités profondes, il n'a pas été possible d'isoler des streptocoques. Ces résultats sont en concordance avec ceux de l'étude de Simón-Soro et Guillen-Navarro [28] qui avait pour but l'identification des espèces microbiennes dans les lésions carieuses pour déterminer l'étiologie des caries dentaires, par le prélèvement des échantillons de caries d'émail non cavitaires ($n=15$) et des échantillons de lésions de caries dentaires ($n=12$) sur 13 individus. Les lésions de l'émail et de la dentine avaient une composition bactérienne différente. Les lactobacilles ont été trouvés presque exclusivement dans les cavités dentinaires.

Les streptocoques représentaient 40% de la communauté active totale dans les caries amélares et 20% dans les caries dentinaires [28].

Dans la littérature, différentes méthodes in vitro ont été utilisées pour étudier l'activité antibactérienne des matériaux dentaires. Tout au long de leurs expériences utilisant des souches de St. mutans, Boeckh et Schumacher [29] ont démontré le rôle important de ce microorganisme dans l'étiologie des caries. Ils sont les microorganismes les plus cariogènes en raison de leurs caractéristiques métaboliques et de leur activité. Cependant, en 2015 Simon-Soro et Mira [26] ont suggéré la nécessité de poursuivre les études, qui emploieraient d'autres microorganismes oraux, y compris Streptococcus sp, Lactobacillus sp, Actinomyces sp. et les anaérobies Gram négatif. Dans l'étude de Da Silva et Zuanon [30], des souches impliquées dans le développement de maladies bucco-dentaires, tel que St. mutans, St. sobrinus, Ae. viscosus, Lb. acidophilus ont été utilisées.

Il est donc important d'inclure plusieurs souches de groupes bactériens pour tirer des conclusions sur l'activité inhibitrice des CVI. Dans notre étude, en plus des Streptococcus mutans, d'autres espèces de streptocoques ont été sélectionnées pour tester l'effet antibactérien des CVI et CVIMAR, notamment, St. bovis, St. porcinus, les Aerococcus viridans et St. uis I et II.

Depuis la découverte du St. mutans en 1924 par Clark, plusieurs chercheurs [9, 16, 31, 32] ont isolé, à partir de dents cariées des humains et des animaux, de nombreuses souches de St. mutans en utilisant divers milieux de croissance complexes y compris le milieu MS [33]. La gélose MS est maintenant couramment utilisée pour isoler les St. mutans ainsi que d'autres espèces de Streptococcus des autres écosystèmes.

Sur cette base, nous avons utilisé un milieu d'isolement et de différenciation (gélose MSFA) pour St. mutans, qui contient les glucides mannitol et sorbitol comme sources de carbone et l'extrait de levure principalement comme source d'azote. L'ajout d'azide de sodium et de fuchsine basique offre certains avantages par rapport à d'autres milieux d'isolement ; le premier supprime la croissance des microorganismes Gram négatif, y compris Proteus, et le dernier réduit le développement des organismes Gram positif indésirables. De plus, la fuchsine basique a l'avantage de produire des colonies colorées.

Étant donné que les St. mutans et d'autres espèces de Streptococcus sont des producteurs d'acide, du carbonate de calcium précipité a été ajouté au milieu pour neutraliser les acides produits, ce qui, à son tour, a amélioré la croissance microbienne à la surface de la gélose. En raison de la teneur en carbonate de calcium du milieu, les colonies productrices d'acide semblaient entourées d'une zone claire par une vérification visuelle pratique. Par conséquent, la nouvelle gélose MSFA par rapport au milieu MS est plus utile pour l'isolement des souches de St. Mutans et sa différenciation des autres streptocoques oraux.

De plus, le milieu est facile à préparer en raison de sa composition simple et unique, il est chimiquement stable et il a une longue durée de conservation. Le milieu peut être aussi utilisé dans des conditions aérobies et anaérobies [13]. La raison pour laquelle, nous avons opté pour le choix de ce milieu.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'action antibactérienne des CVI sur les *St. mutans*, c'est ce que nous avons démontré dans les résultats obtenus où les deux types de CVI (conventionnel et modifié par adjonction de résine) ont montré une activité antibactérienne sur les *St. mutans* en particulier et même sur les autres groupes de streptocoques sélectionnés mais avec des degrés variables. Cependant, nous n'avons pas trouvé de différence significative de cette action entre les 02 groupes testés (CVIc et CVIMAR) ($P=0,758$). Ces résultats sont en corrélation avec ceux d'autres travaux de recherche et la synthèse de ces différentes études est la suivante.

Seppä et Torppa-Saarinen [34], Khare et Hiremath [9] ont rapporté que les verres ionomères ont des propriétés antibactériennes *in vitro*. De plus, il a été signalé que la croissance de *St. mutans* était inhibée *In vivo* autour des restaurations en ciments verres ionomères conventionnels et en argent, ce qui a généralement été attribué aux fluorures libérées par les matériaux. Wei et al., [35] ont examiné la croissance de *St. Mutans* pendant 48 h sur divers matériaux de restauration et sur les surfaces dentaires. Moins de *St. Mutans* ont été observés sur les surfaces dentaires et les surfaces lisses des restaurations aux CVIc, aux CVI modifiés à la résine et aux CVI contenant de la caséine phosphopeptide-phosphate de calcium amorphe, par rapport aux matériaux à base de résine. Trois hypothèses sont avancées pour expliquer le pouvoir cariostatique du fluor, l'inhibition du métabolisme bactérien, l'augmentation de la résistance à la dissolution des tissus dentaires et le pouvoir de reminéralisation des tissus déminéralisés. Ce dernier a été démontré par l'étude d'Eickholz et Pioch [36], utilisant un modèle de molaires humaines et d'obturations tunnels *In vitro*, montrant que la présence du CVI, *in situ* en position interne sous l'émail, inhibe significativement la progression des déminéralisations induites par l'application de gel acide sur les surfaces proximales alors que les déminéralisations se poursuivent dans la dentine en l'absence du CVI. *In vivo*, Wood et al., [37] ont trouvé moins de caries récurrentes adjacentes aux obturations CVI par rapport aux obturations amalgames chez des patients irradiés présentant des xérostomies.

Powell et Johnson [38] ont constaté moins de récurrences de caries autour des restaurations CVI (3 %), qu'autour des restaurations composites (10 %) après 3 ans. L'ensemble de ces travaux tend à confirmer le rôle cario-protecteur des CVI et leur aptitude à inhiber les caries récurrentes [39].

L'activité antibactérienne des CVIMAR a été aussi évaluée dans une étude *In vitro*, par Vermeersch et Leloup [40], en les mettant au contact de cultures de *St. mutans*, sous incubation, pendant deux jours. En mesurant ensuite la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, induite par les ciments, le CVI hybride a présenté la zone d'inhibition la plus large, derrière l'Ampicilline, puis le CVIc. Des résultats similaires ont été trouvés dans des études menées par Shirani et al., Nicholson et al., [41, 42], où les CVIMAR ont permis de réduire le nombre de *St. mutans* *in vitro*. Duque et al., [43] ont également comparé l'activité antimicrobienne du CVI, CVIMAR et CVI condensables contre les *St. mutans*, *St. sobrinus*, *Lb. acidophilus* et *Ae. viscosus*. Ils ont trouvé que les CVIc et les CVIMAR présentaient la meilleure activité antimicrobienne contre les *St. mutans* et *St. sobrinus*.

Notre étude a pu en outre, déterminer avec précision, le type de l'activité antimicrobienne des CVI. Le mode d'action des deux types de CVI (CVIc et CVIMAR) est de type bactéricide uniquement sur *St. mutans*. Une résistance aux deux CVI a été observée chez *St. bovis*, *St. porcinus*, *St. suis* et *Aerococcus viridans*.

Conclusion

Sur la base des résultats de la présente étude, il a été montré que les bactéries impliquées dans les caries dentaires appartenaient aux espèces de *St. mutans* avec un pourcentage de 28,6 %. Les espèces de *St. suis* (28,6%) *St. porcinus* (14,3%) avec *St. bovis* (14,3%) et *Aerococcus viridans* (14,2%) sont aussi présentes. Les cinq groupes de bactéries ont présenté une activité hémolytique. Le test de la sensibilité aux antibiotiques a révélé que les espèces de *St mutans* étaient les plus sensibles. Les deux types de CVI (CVIc, CVIMAR) étudiés ont produit un effet bactéricide sur le *St. mutans*. En revanche l'effet antibactérien était plutôt bactériostatique ou inexistant sur les autres espèces de Streptococcus étudiées. Il n'a pas été observé de différence significative entre l'effet antibactérien des CVIc et celui des CVIMAR sur les *St. mutans*.

Par conséquent, l'utilisation des CVI en tant que matériaux de restauration, pour prévenir ou du moins limiter l'extension des caries résiduelles et récurrentes mérite d'être reconsidérée par les praticiens. Ils doivent être largement recommandés en pratique quotidienne surtout chez les patients présentant un risque carieux élevé.

Comme perspectives, la présente étude nous oriente vers la recherche des différents facteurs permettant d'optimiser l'efficacité des ciments verres ionomères sur les germes cariogènes.

Remerciements

Les auteurs remercient Mr Merrahi Abdelkader, technicien supérieur au Laboratoire de microbiologie appliquée, Département de biologie, faculté SNV, Université Oran 1 Ahmed Ben Bella, pour son assistance technique en microbiologie.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Références bibliographiques

- [1] Nicolas GG, Lavoie MC. Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. (2010). Canadian Journal of Microbiology. 57(1):1-20. doi:10.1139/W10-095.
- [2] Pagano S, Chieruzzi M, Balloni S, Lombardo G, Torre L, Bodo M, et al. (2019). Biological, thermal and mechanical characterization of modified glass ionomer cements: The role of nanohydroxyapatite, ciprofloxacin and zinc l-carnosine. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 94:76-85. doi:10.1016/j.msec.2018.09.018.
- [3] Fucio SB, Paula AB, Sardi JC, Duque C, Correr-Sobrinho L, Puppini-Rontani RM. (2016). Streptococcus Mutans Biofilm Influences on the Antimicrobial Properties of Glass Ionomer Cements. Braz Dent J. 27(6):681-7. doi:10.1590/0103-6440201600655.
- [4] Kuramitsu HK, Wang BY. (2006). Virulence properties of cariogenic bacteria. BMC Oral Health. BioMed Central. Jun 15;6 Suppl 1(Suppl 1):S11. doi: 10.1186/1472-6831-6-S1-S11.
- [5] Loesche WJ. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. 50(4):353-80. doi: 0146-0749/86/040353-28\$02.00/0.
- [6] Banas J. (2004). Virulence properties of Streptococcus mutans. 9(10):1267-77. doi: 10.2741/1305.
- [7] Nakajo K, Imazato S, Takahashi Y, Kiba W, Ebisu S, Takahashi NJDM. (2009). Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. Journal of Power Sources. 25(6):703-8. doi: 10.1016/j.dental.2008.10.014.
- [8] Paiva L, Fidalgo TKS, da Costa LP, Maia LC, Balan L, Anselme K, et al. (2018). Antibacterial properties and compressive strength of new one-step preparation silver nanoparticles in glass ionomer cements (NanoAg-GIC). J Dent. 69:102-9. doi:10.1016/j.jdent.2017.12.003.
- [9] Khere CH, Hiremath H, Sandesh N, Misar P, Gorie N. (2019). Evaluation of antibacterial activity of three different glass ionomer cements on streptococcus mutans: an in-vitro antimicrobial study. Med Pharm Rep. 92(3):288-93. doi:10.15386/mpr-1113.
- [10] Amend S, Frankenberger R, Lückner S, Domann E, Krämer N. (2018). Secondary caries formation with a two-species biofilm artificial mouth. J Dental Materials. 34(5):786-96. doi: 10.1016/j.dental.2018.02.002.
- [11] Park EY, Kang S. (2020). Current aspects and prospects of glass ionomer cements for clinical dentistry. Yeungnam Univ J Med. 37(3):169-78. doi:10.12701/yujm.2020.00374.
- [12] Lanyi B. (1988). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. Methods in microbiology (Vol. 19, pp. 1-67): Elsevier.
- [13] Linke H. (1977). New method for the isolation of Streptococcus mutans and its differentiation from other oral streptococci. Journal of clinical microbiology. 5:604-609. [14] Holt JG, Krieg NR, Sneath PH. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams.
- [15] Liljemark W, Okrent D, Bloomquist C. (1976). Differential recovery of Streptococcus mutans from various mitis-salivarius agar preparations. J Clin Microbiol. Jul; 4(1): 108-109.
- [16] Kimmel L, Tinanoff N. (1991). A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. Oral Microbiol Immunol. Oct;6(5):275-9. doi: 10.1111/j.1399-302x.1991.tb00491.x.
- [17] Mishra A, Pandey RK, Manickam N. (2017). Antibacterial effect and physical properties of chitosan and chlorhexidine-cetrimide-modified glass ionomer cements. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 35(1):28-33. doi:10.4103/0970-4388.199224.
- [18] Ribeiro J, Ericson D. (1991). In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. Scand J Dent Res. 99(6):533-40. doi:10.1111/j.1600-0722.1991.tb01066.x
- [19] Bellis CA, Addison O, Nobbs AH, Duckworth PF, Holder JA, Barbour ME. (2018). Glass ionomer cements with milled, dry chlorhexidine hexametaphosphate filler particles to provide long-term antimicrobial properties with recharge capacity. Dent Mater. 34(12):1717-26. doi:10.1016/j.dental.2018.09.003.
- [20] Pedrini D, Gaetti-Jardim Junior E, de Vasconcelos AC. (2001). Retention of oral microorganisms on conventional and resin-modified glass-ionomer cements. Pesqui Odontol Bras. 15(3):196-200. doi:10.1590/s1517-74912001000300004.
- [21] Luczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Zalewska A, Pawinska M, Leszczynska K. (2014). Antibacterial activity of selected glass ionomer cements. Postepy Hig Med Dosw (Online). 22;68:23-8. doi: 10.5604/17322693.1086069.
- [22] Triola M, Triola MF. (2012). Biostatistique pour les sciences de la vie et de la santé: édition revue et corrigée: Pearson Education France.
- [23] Klai S, Altenburger M, Spitzmuller B, Anderson A, Hellwig E, Al-Ahmad A. (2014). Antimicrobial effects of dental luting glass ionomer cements on Streptococcus mutans. Scientific World Journal. Mar 23;807086. doi: 10.1155/2014/807086.
- [24] Kiska D, Gilligan P, Murray P, Baron E, Pfaller MJA. (1999). Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

- [25] Banerjee A, Watson T, Kidd EA. (2001). Dentine caries: take it or leave it?. *Journal of the South African Dental Association*. Apr;56(4):186-92.
- [26] Simón-Soro A, Mira AJ. (2015). Solving the etiology of dental caries. *J Trends in microbiology*. Feb;23(2):76-82. doi: 10.1016/j.tim.2014.10.010.
- [27] Hugar SM, Assudani HG, Patil V, Kukreja P, Uppin C, Thakkar P. (2016). Comparative Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Type II Glass Ionomer Cement, Type IX Glass Ionomer Cement, and AMALGOMER™ Ceramic Reinforcement by Modified "Direct Contact Test": An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. Apr-Jun;9(2):114-7. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1345.
- [28] Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol*. Oct 24;6:25443. doi: 10.3402/jom.v6.25443.
- [29] Boeckh C, Schumacher E, Podbielski A, Haller B. (2002). Antibacterial activity of restorative dental biomaterials in vitro. *Caries Res*. Mar-Apr;36(2):101-7. doi:10.1159/000057867.
- [30] Da Silva RC, Zuanon ACC, Spolidorio DMP, Campos JADB. (2007). Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. *J Mater Sci Mater Med*. Sep;18(9):1859-62. doi: 10.1007/s10856-007-3035-4.
- [31] Vohra F, Altwaim M, Alshuwaier AS, Deeb MA, Alfawaz Y, Alrabiah M, et al. (2020). Influence of Bioactive, Resin and Glass Ionomer luting cements on the fracture loads of dentin bonded ceramic crowns. *Pak J Med Sci*. Mar-Apr;36(3):416-421. doi: 10.12669/pjms.36.3.1946
- [32] Sun L, Yan Z, Duan Y, Zhang J, Liu B. (2018). Improvement of the mechanical, tribological and antibacterial properties of glass ionomer cements by fluorinated graphene. *Dent Mater*. Jun;34(6):e115-e127. doi: 10.1016/j.dental.2018.02.006.
- [33] Jordan H, Krasse B, Möller A. A method of sampling human dental plaque for certain "caries-inducing" streptococci. *Arch Oral Biol*. Aug;13(8):919-27. doi: 10.1016/0003-9969(68)90007-1.
- [34] Seppä L, Torppa-Saarinen E, Luoma H. (1992). Effect of different glass ionomers on the acid production and electrolyte metabolism of streptococcus mutans in vitro. *Caries Res*. 26(6):434-8. doi: 10.1159/000261483.
- [35] Wei C, Leung W, Burrow M. (2019). Evaluation of in vitro Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii attachment and growth on restorative materials surfaces. *Aust Dent J*. Dec;64(4):365-375. doi: 10.1111/adj.12715.
- [36] Eickholz P, Pioch T, Lenhard M. (1997). Progression of dental demineralization with and without modified tunnel restorations in vitro. *Oper Dent*. Sep-Oct;22(5):222-8.
- [37] Wood R, Maxymiw W, McComb D. (1993). A clinical comparison of glass ionomer (polyalkenoate) and silver amalgam restorations in the treatment of Class 5 caries in xerostomic head and neck cancer patients. *Oper Dent*. May-Jun;18(3):94-102
- [38] Powell L, Johnson G, Gordon G. (1995). Factors associated with clinical success of cervical abrasion/erosion restorations. *Oper Dent*. Jan-Feb;20(1):7-13.
- [39] Lasfargues J, Bonte E, Goldberg M, Jonas P, Tassery H. (1998). Ciments verres ionomères et matériaux hybrides. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*. Elsevier, Paris, Odontologie.
- [40] Vermeersch G, Leloup G, Delmee M, Vreven J. (2005). Anti bacterial activity of glass-ionomer cements, compomers and resin composites: relationship between acidity and material setting phase. *J Oral Rehabil*. May;32(5):368-74. doi: 10.1111/j.1365-2842.2004.01300.x.
- [41] Shirani F, Havaei A, Malekipour M, Sharafi M. (2008). Surface Antibacterial Properties of Four Tooth-Colored Restorative Materials. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Science*. 5(1):1-6.
- [42] Nicholson JW, Sidhu SK, Czarnecka B. (2020). Enhancing the Mechanical Properties of Glass-Ionomer Dental Cements: A Review. *Materials (Basel)*. May 31;13(11):2510. doi: 10.3390/ma13112510.
- [43] Duque C, Negrini Tdc, Hebling J, Spolidorio DMP. (2005). Inhibitory activity of glass ionomer cements on cariogenic bacteria. *Oper Dent*. Sep-Oct;30(5):636-40.

