

# PREVALÊNCIA DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO MUTANS E LEVEDURAS NA SALIVA DE 93 MEMBROS DE SEIS FAMÍLIAS

Fabiana Cristina Pimenta,<sup>1</sup> José Moacir Marin,<sup>2</sup> Milton de Uzeda<sup>3</sup> e Izabel Yoko Ito<sup>2</sup>

## RESUMO

Vários estudos mostram a associação entre a prevalência de cárie e o número de estreptococos do grupo *mutans* (SGM) e outros microrganismos na saliva. Neste estudo foi investigada a presença de estreptococos do grupo *mutans* e leveduras na saliva de 93 indivíduos pertencentes a seis famílias com, no mínimo, três gerações. Amostras de saliva não estimulada foram coletadas, as quais foram diluídas e semeadas em ágar SB20 e CHROMagar Cândida para o isolamento de SGM e leveduras, respectivamente. Após o período de incubação, as colônias com características macroscópicas típicas foram contadas e repicadas em meios de cultura adequados para a identificação bioquímica. Os SGM foram isolados de 80 (86,0%) indivíduos e as contagens variaram de  $0,003 \times 10^5$  (log 2,477) a  $1600 \times 10^5$  (log 8,204) ufc/mL de saliva. Todos os 73 adultos estavam colonizados por SGM, mas estas bactérias foram detectadas em apenas sete (35,5%) das 20 crianças. Destes, 51 (63,7%) estavam colonizados pelo *Streptococcus mutans*, dois (2,5%) albergavam apenas o *Streptococcus sobrinus* e 27 (33,8%) *S. mutans* e *S. sobrinus*. Além disso, 64 (68,6%) indivíduos estavam colonizados por leveduras. Os resultados mostraram uma elevada prevalência (86,0%) de SGM e leveduras (68,6%) na saliva, indicando um alto risco de transmissão intrafamiliar destes microrganismos.

**UNITERMOS:** Estreptococos do grupo *mutans*. Leveduras. Prevalência. Saliva.

## INTRODUÇÃO

De acordo com Quirynen et al. (1995), a boca apresenta uma microbiota complexa, com inúmeros microambientes que permitem o

1 Professora Assistente do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

2 Universidade de São Paulo.

3 Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Endereço para correspondência: Rua Delenda Resende de Melo eq. c/ 1º Avenida, Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás. E-mail: pimenta@hotmail.com

Recebido para publicação em 15/8/2000. Revisto em 12/2/2001. Aceito em 15/3/2001.

desenvolvimento de diversos microrganismos. Além disso, os aspectos ecofisiológicos da boca e de sua microbiota a diferenciam de qualquer outro sítio do corpo humano, corroborado pelo fato de ser o único nicho que contém uma superfície sólida não descamável (dente) e superfície mole descamável (mucosa). Pearce et al. (1995) descreveram que a microbiota da boca é constituída por 528 espécies compreendendo 30 gêneros microbianos. Assim, estes microrganismos interagem e formam o biofilme dentário (placa dentária), que representa um ecossistema dinâmico constituído pela comunidade microbiana complexa embebida em matriz de polímeros salivares e de polissacarídeos microbianos extracelulares (Costerton, 1987).

A cárie dentária, a gengivite, a periodontite, bem como outras doenças infecciosas da boca, são decorrentes, primordialmente, da formação do biofilme dentário e os estreptococos do grupo *mutans* (SGM) são considerados agentes etiológicos da cárie (Loesche, 1993), sendo descrita uma correlação entre o número de lesões cariosas e o número de SGM na saliva (Reich et al., 1999). A colonização da criança pelo SGM depende da transmissão intrafamiliar e as mães são consideradas as principais fontes de infecção (Caufield, 1997; Packer et al., 1999). Além dos SGM, os lactobacilos e as leveduras podem estar associados à doença cárie. Loesche et al. (1995) relataram um aumento no número de leveduras e lactobacilos com o estabelecimento da lesão de cárie. No caso específico das leveduras, outros fatores também estão associados, como diminuição do fluxo salivar, presença de próteses e as condições socioeconômicas.

Considerando a correlação entre a prevalência de cárie e a contagem de microrganismos na saliva, o objetivo deste trabalho foi detectar estreptococos do grupo *mutans* e leveduras na saliva de 93 membros de seis famílias da região de Ribeirão Preto com, no mínimo, três gerações.

## MATERIAL E MÉTODOS

Após o consentimento formal, aproximadamente 2 mL de saliva não estimulada foram coletados, em tubos com pérolas de vidro, de 93 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, com, no mínimo, três gerações, da região de Ribeirão Preto. A família A era constituída por 11 membros, a B por 10 e a C por oito, e todas apresentavam quatro gerações. As famílias D, E e F, com três gerações, apresentavam 16, 23 e 25 membros, respectivamente. As amostras de saliva coletadas foram homogeneizadas por um minuto e submetidas a diluição decimal em salina fosfatada tamponada. Aliquotas de 50 µL foram gotejadas (Westergreen & Krasse, 1978) em ágar SB20 (Davey & Roger, 1984) para o isolamento de SGM e 0,1 mL semeado em placa de Petri contendo CHROMagar Cândida para o isolamento de leveduras. As placas foram incubadas a 37° C, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas a leitura e a contagem baseadas nas características

macroscópicas das colônias, e os resultados apresentados em potência de  $10^5$  ufc/mL e também em log de 10. As colônias identificadas de acordo com suas características macroscópicas foram repicadas em meios de cultura adequados para a realização das provas bioquímicas de identificação (Shklair & Keene, 1978; Ito et al., 1993).

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as características dos 93 membros das seis famílias analisadas. Dentre os 93 indivíduos, 53 (57,0%) eram do sexo feminino e 40 (43,0%) do sexo masculino. A média de idade dos indivíduos pertencentes à primeira geração foi de 71,2 anos, sendo constituída por 19 pessoas. A segunda geração apresentou 34 indivíduos, com a média de idade de 46,1 anos, e a terceira geração 31 pessoas, sendo 18 adultos, com uma média de 21,1 anos, e 13 crianças com idade média de 4,5 anos. A quarta geração das três outras famílias compreendia 9 crianças, cuja idade média foi de 4,4 anos.

Tabela 1. Distribuição dos 93 membros de seis famílias brasileiras de acordo com sexo, geração e média de idade

Família	A		B		C		D		E		F		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Membros	11	11,8	10	10,8	8	8,6	23	24,7	16	17,2	25	26,9	93	100,0
Sexo Fem.	6	54,5	6	60,0	6	75,0	15	65,2	7	43,7	13	52,0	53	57,0
Sexo Masc.	5	45,5	4	40,0	2	25,0	8	34,8	9	56,3	12	48,0	40	43,0
Idade média	n°	X	n°	X	n°	X	n°	X	n°	X	n°	X	n°	X
Geração 1 <sup>a</sup>	2	78,0	2	81,0	1	76,0	3	63,0	2	76,0	9	53,1	19	71,2
Geração 2 <sup>a</sup>	2	60,0	2	58,5	1	56,0	11	31,7	7	45,0	11	25,3	34	46,1
Geração 3 <sup>a</sup>														
Criança	-	-	-	-	-	-	5	8,0	3	3,0	5	2,6	13	4,5
Adulto	3	34,0	4	30,8	3	29,7	4	17,0	4	16,7	-	-	18	21,4
Geração 4 <sup>a</sup>	4	1,5	2	4,0	3	7,7	-	-	-	-	-	-	9	4,4

A Tabela 2 apresenta a prevalência de SGM e leveduras na população estudada. Todos os 73 adultos estavam colonizados pelos SGM, mas estas bactérias foram detectadas em apenas 7 (35,5%) das 20 crianças. Destes, 51 (63,7%) estavam colonizados pelo *Streptococcus mutans*, 2 (2,5%) albergavam apenas o *Streptococcus sobrinus* e 27 (33,8%) *S. mutans* e *S. sobrinus*. A porcentagem de isolamento de leveduras foi semelhante nas seis famílias, sendo que 64 (68,6%) indivíduos estavam colonizados. A prevalência de leveduras nas famílias variou de 60,0% a 75,0%, com uma média de 68,6%.

Tabela 2. Distribuição de SGM, *S. mutans*, *S. sobrinus* e leveduras na saliva de 93 membros de seis famílias

Família	A		B		C		D		E		F		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Membros	11	11,8	10	10,8	8	8,6	23	24,7	16	17,2	25	26,9	93	100,
SGM pos.	8	72,7	9	90,0	7	87,5	22	95,7	13	81,2	21	84,0	80	86,0
<i>S. mutans</i>	7	87,5	3	33,3	5	71,4	8	36,4	11	84,6	17	81,0	51	63,7
<i>S. sobrinus</i>	0	0,0	1	11,1	0	0,0	1	4,5	0	0,0	0	0,0	2	2,5
<i>S. mutans</i> + <i>S. sobrinus</i>	1	12,5	5	55,6	2	28,6	13	59,1	2	15,4	4	19,0	27	33,8
Leveduras	8	72,7	7	70,0	6	75,0	14	60,9	12	75,0	17	68,9	64	68,6

As Tabelas 3 e 4 mostram a distribuição dos 80 membros das famílias de acordo com os diferentes níveis salivares de SGM. Os níveis de SGM variaram de  $0,003 \times 10^5$  (log 2,477) a  $1600,0 \times 10^5$  (log 8,204). Foi observado que 24 (25,8%) indivíduos albergavam um número menor que  $10^5$  (log 5,0) ufc/mL de SGM, 27 (29,0%)  $10^5$  (log 5,0) e, 29 (31,2%), nível igual ou maior que  $10^6$  (log 6,0).

Tabela 3. Níveis extremos ( $10^5$  e  $\log^{10}$  ufc/mL) de SGM, *S. mutans* e *S. sobrinus* em 80 membros das seis famílias

Família	A		B		C		D		E		F	
	Ufc	$10^5$	log	$10^5$	log	$10^5$	log	$10^5$	log	$10^5$	log	
< SGM	0,04	3,602	4	5,602	0,003	2,477	0,03	3,477	0,03	3,477	0,003	2,477
> SGM	165	7,217	1600	8,204	167000	7,223	160	7,204	44	6,643	244000	7,387
< <i>S. mutans</i>	0,04	3,602	4	5,602	0,002	2,301	0,03	3,477	0,03	3,477	0,003	2,477
> <i>S. mutans</i>	165	7,217	1600	8,204	167000	7,223	157	7,196	44	6,643	200	7,301
< <i>S. sobrinus</i>	3	5,477	0,15	4,176	0,001	1,788	0,017	3,230	3,4	5,531	0,016	3,204
> <i>S. sobrinus</i>	3	5,477	56	6,748	0,002	2,301	23000	6,362	5	5,699	44000	6,643

Tabela 4. Distribuição dos estreptococos do grupo *mutans* (SGM) de acordo com os níveis salivares nos 80 membros das seis famílias

Família	A		B		C		D		E		F		Total	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Membros	11	11,8	10	10,8	8	8,6	23	24,7	16	17,2	25	26,9	93	100
SGM = 0	3	27,2	1	10,0	1	12,5	1	4,3	3	18,7	4	16,0	13	14,0
SGM < $10^5$	2	18,2	0	0	2	25,0	8	34,8	4	25,0	8	32,0	24	25,8
SGM = $10^5$	1	9,1	3	30,0	3	37,5	9	39,2	5	31,3	6	24,0	27	29,0
SGM => $10^6$	5	45,5	6	60,0	2	25,0	5	21,7	4	25,0	7	28,0	29	31,2

## DISCUSSÃO

A associação entre a incidência de cárie e os níveis de estreptococos do grupo *mutans* na saliva ou biofilme dentário é bem estabelecida (Loesche, 1993). Normalmente, a aquisição dos SGM ocorre nos primeiros anos de vida da criança e a mãe é considerada a fonte primária, mas outros membros da família podem estar associados à transmissão (Caufield, 1997; Emanuelsson & Wang, 1998).

Neste estudo, os estreptococos do grupo *mutans* foram detectados em 80 (73 adultos e 7 crianças) de 93 membros das seis famílias brasileiras, sendo a prevalência do SGM de 86,0% (Tabelas 2 e 3). A maior prevalência de SGM foi observada na família D (95,7%) e a menor na família A (72,7%). Todos os adultos estavam colonizados pelo SGM. Apesar de serem populações diferentes, a prevalência encontrada neste estudo é similar aos resultados de Gábris et al. (1999), que detectaram a taxa de 89,7% de adolescentes portadores de SGM.

Dezoito adultos usavam dentaduras, 66,7% destes apresentavam níveis de SGM iguais ou superiores a  $10^6$  (log 6,0) e todos albergavam leveduras. Os elevados níveis de SGM detectados em usuários de próteses estão de acordo com Salonen et al. (1990), que mostraram uma maior prevalência de SGM em indivíduos usuários de próteses.

Os estreptococos do grupo *mutans* foram detectados em 7 (35,0%) das 20 crianças, e todos tinham mais de 5 anos de idade. Alaluusua et al. (1984) encontraram uma baixa prevalência de *Streptococcus mutans* em crianças menores de 5 anos, sendo que apenas 6% das crianças apresentavam elevados índices de colonização por SGM. Grindejord et al. (1991), pesquisando os SGM em 1.095 crianças de um ano, detectaram a bactéria em apenas 6,0% da população. Neste estudo, 35,0% das crianças estavam colonizadas, e esta prevalência é similar à relatada por Berkowitz et al. (1981), que detectaram *S. mutans* em 38 (24,4%) de 156 crianças analisadas.

Berkowitz et al. (1981) analisaram 156 pares mãe-filho. O *S. mutans* foi detectado em 38 (24,4%) dos 156 infantes. A média dos níveis de *S. mutans* nas 38 mães das crianças infectadas foi de  $1,2 \times 10^6$  ufc/mL. Em contraste, a média de *S. mutans* das 118 mães das crianças não infectadas era  $2,0 \times 10^5$  ufc/mL, mostrando a correlação entre nível de *S. mutans* nas mães e o risco de infecção da criança. Quando o nível de SGM nas mães era  $10^5$  ufc/mL, a porcentagem de infecção dos infantes foi 58,0%. Por outro lado, a porcentagem de infecção foi de 6,5%, quando as mães apresentavam  $10^3$  ufc/mL. Assim, mostraram que o risco de infecção da criança foi nove vezes maior quando o nível de SGM era igual ou maior que  $10^6$ . Neste estudo, 29 (31,2%) adultos apresentaram níveis de SGM igual ou maior que  $10^6$  (log 6,0), mostrando um elevado risco de infecção para as crianças.

Na família B foi observada uma prevalência similar de *S. mutans* e *S. sobrinus* e a maior taxa de infecção pelo SGM. O maior nível [ $1600,0 \times 10^5$  (log 8,204)] foi detectado no avô que usava dentadura. A família C apresentou o menor índice salivar do SGM (Tabela 4).

Detectou-se a prevalência de *Streptococcus mutans* nas famílias A, C, E e F. Entretanto, nas famílias B e D foi observada prevalência similar de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Tabelas 3 e 4). A maior prevalência de *S. sobrinus* foi observada nas famílias B e D, sendo que 5 (55,6%) e 13 (61,9%) membros estavam colonizados, respectivamente. Em cada família foi detectado um indivíduo colonizado apenas por *S. sobrinus*. Na família B foi detectada a maior prevalência de *S. sobrinus* e os maiores índices de SGM ( $1600,0 \times 10^5$ /log 8,204) e todos os membros albergavam níveis de SGM maiores do que  $10^5$  ufc/mL (Tabelas 3 e 4).

Caufield et al. (1988) mostraram que o nível de SGM na mãe está correlacionado com os encontrados nas crianças. A incidência de SGM aumenta com a idade e número de dentes irrompidos, sendo que na idade de pré-escola 50,0% das crianças estão colonizadas (Gábris et al., 1999). Neste estudo o SGM foi isolado de todos membros adultos indicando um elevado risco de aquisição da bactéria pelas crianças. Köhler & Andreen (1994) mostraram que a redução de SGM nas mães durante o irrompimento dos dentes das crianças influenciou a colonização e a experiência de cárie dos seus filhos. Com o intuito de prevenir e reduzir o desenvolvimento da cárie é importante introduzir medidas restauradoras e preventivas que reduzam o número de estreptococos do grupo *mutans* nos pais e familiares, retardando a colonização das crianças (Torres et al., 1999).

A ocorrência de microrganismos oportunistas, na boca, como a Cândida, está associada às condições de saúde do indivíduo. Fatores como a idade, diminuição do fluxo salivar e uso de próteses contribuem para o aumento de leveduras na boca (Kuc et al., 1999). Wilkieson et al. (1991) mostraram que 88% de uma população de idosos albergavam leveduras na boca. Kuc et al. (1999) avaliaram a microbiota bucal de 63 idosos e observaram a presença de leveduras em 74,9% da população. Neste estudo, 64 indivíduos albergavam leveduras, portanto a prevalência de indivíduos portadores de leveduras foi de 68,6%, resultado semelhante ao descrito por Kuc et al. (1999), apesar das características das populações avaliadas serem diferentes. A prevalência de isolamento de leveduras nas seis famílias foi semelhante e variou de 60% a 75%. As leveduras foram detectadas em todos os indivíduos que usavam dentaduras. Paranhos (1996) relatou que com a instalação da prótese há a formação de um ambiente adequado para a colonização de leveduras. Webb et al. (1994) detectaram também um elevado número de *C. albicans* no biofilme dentadura.

Portanto, reconhecendo-se a virulência destes microrganismos, é fundamental implementar medidas restauradoras e preventivas para controlar

a microbiota bucal em termos qualitativos e quantitativos e evitar a transmissão intrafamiliar destas bactérias.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostraram uma elevada prevalência de SGM (86,0%) e leveduras (68,6%) na saliva dos membros das famílias analisadas, sugerindo um elevado risco de transmissão intrafamiliar destes microrganismos.

## SUMMARY

Prevalence of *mutans* streptococci and yeasts in the saliva of 93 members from six families.

Several studies report the correlation between the carious prevalence and the number of *mutans* streptococci (MS) and other microorganisms in the saliva. We investigated the distribution of MS and yeasts in the saliva of 93 members of six families with at least 3 generations. Whole non stimulated saliva was collected, diluted and dropped onto SB20 agar and CHROMagar Candida for the isolation of MS and yeasts, respectively. After the incubation, the colonies presenting typical macroscopic characteristics were counted and picked up in specific media for biochemical typing. *Mutans* streptococci were isolated from (86.0%) members and the counts ranged from  $0.003 \times 10^5$  (log 2.477) to  $1600.0 \times 10^5$  (log 8.204) CFU/mL saliva. All 73 adults were colonized by MS, but these bacteria were detected in 7 (35,0%) of the 20 children. *Streptococcus mutans* occurred in 78 (97.5%) members, and 51 (63.7%) were monocolonized. *Streptococcus sobrinus* occurred in 29 (36.3%) and 2 (2.5%) were monocolonized. Twenty-seven (33.8%) persons were colonized with *S. mutans* and *S. sobrinus*. Moreover, 64 (68.6%) members were colonized with yeasts. The results showed a high prevalence (86.0%) of MS and yeasts (68.6%) in the saliva, suggesting the high risk of interfamilial transmission of these microorganisms.

KEYWORDS: *Mutans* streptococci. Yeasts. Prevalence. Saliva.

## REFERÊNCIAS

1. Alaluusua S, Myllärniemi S, Kallio M, *Streptococcus mutans* infection level and caries in a group of 5-year-old children. *Caries Res* 23:190-194, 1984.
2. Berkowitz RJ, Turner J, Green P. Salivary level of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. *Archs Oral Biol* 26:14714-14719, 1981.
3. Caufield PW. Dental caries - a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Pediat Dent* 19:491-498, 1997.

4. Caufield PW, Ratanapridakul K, Allen DN, Cutter GR. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and radical cohorts: implications for natural transmission. *Infect Immun* 56:3216-3220, 1988.
5. Costerton, JW. Bacterial biofilms in nature and diseases. *Ann Rev Microbiol*, 41:435-464, 1987.
6. Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their inter-familial transmission. *Archs Oral Biol* 29:453-460, 1984.
7. Emanuelson IMR, Wang X. Demonstration of identical strains of *mutans* streptococci within Chinese families by genotyping. *Eur J Oral Sci* 106:788-794, 1998.
8. Gábris K, Nagy G, Madléna M, Dénes Z, Márton S, Keszthelyi G, Bánóczy J. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res* 33:191-195, 1999.
9. Grindejford M, Dahllöf G, Wilkna S, Höjer B, Modéer T. Prevalence of *mutans* streptococci in one-year-old children. *Oral Microbiol Immun* 6:280-283, 1991.
10. Ito, IY; Albuquerque Jr, RF; Alonso Verri, R. Estreptococcus: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral. In: 15ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 1993. Programas e resumos. Ribeirão Preto, FORP, 1993, p.5.
11. Köhler B, Andreen I. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. *Archs Oral Biol* 39:907-911, 1994.
12. Kuc IM, Samaranyake LP, Heyst EN. Oral health and microflora in an institutionalized elderly population in Canada. *Int Dent J* 49:33-40, 1999.
13. Loesche WJ. *Cárie dental: uma infecção tratável*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1993. p.41-48.
14. Loesche WJ, Schork A, Terpenning YM, Stoll J. Factors which influence levels of selected organisms in saliva of older individuals. *J Clin Microbiol* 33: 2550-2557, 1995.
15. Packer BN, Valent PHM, Bretz WA. Avaliação de fatores relacionados à transmissão de infecções pelos estreptococos do grupo *mutans*. *Rev ABO Nac* 7:108-113, 1999.
16. Paranhos HFO. Experimentação clínica de um dentífrico específico para a higienização de próteses totais. Ribeirão Preto [Tese de Doutorado - FORP - USP], 1996.
17. Pearce C, Bowden GH; Evans M, Fitzsimmons SP, Johnson J, Sheridan MJ, Cole MF. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 42: 67-72, 1995.
18. Quirynen M, Marechal M, Busscher H, EL-Albiad M, Arends J, van Steenberghe D. The influence of surface characteristics on the early bacterial colonization of intra-oral hard surfaces. *J Clin Res* 20: 13-18, 1995.
19. Reich E, Lussi A, Newbrun E. Caries risk assessment. *Int Dent J* 49:15-26, 1999.
20. Salonen L, Allander L, Bratthall D, Hellden L. *Mutans* streptococci, oral hygiene, and caries in adult Swedish population. *J Dent Res* 69:1469-1475, 1990.
21. Shklair IL, Keene HJ, A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 23:361-366, 1978.
22. Torres AS, Rosa OPS, Akiyoshi N, Silveira AMM, Bretz WA. Infection levels in pregnant women by *mutans* streptococci. *Rev Odontol Univ São Paulo* 13:225-231, 1999.
23. Webb BC, Willcox MDP, Thomas CJ, Mercado MD, Knox KW. Preliminary investigation of the microflora of denture plaque. *J Dent Res* 73:740, 1994.
24. Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 7:82-83, 1978.
25. Wilkieson C, Samaranyake LP, MacFarlane TW. Oral candidose in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med* 20: 13-16, 1991.