

# Passiv immunisering mot karies

Carina Krüger Weiner

Det råder en dynamisk balans mellan den endogena (kroppsegna) mikrofloran och kroppens immunförsvar. Vår normala mikroflora spelar en viktig roll i upprätthållandet av hälsa och i skyddet mot sjukdomar.

I munhålan och i resten av mag-tarmkanalen spelar mikroorganismers förmåga till vidhäftning (adhesion) en stor roll för utvecklingen av sjukdom. Adhesion styrs av adhesiner på ytan av bakterier och receptorer på tandpelliceln och möjliggör för bakterierna att fästa och kolonisera.

I dag är ett av de allvarligaste hoten mot mänsklighetens existens bakteriers förmåga till resistensutveckling mot antibiotika. Ett angeläget och stort forskningsområde är därför möjligheten att hitta nya behandlingsmetoder, till exempel vaccin. Munhålan och munhålan sjukdomar är inget undantag.

Att kunna framställa vaccin mot karies har varit ett aktivt forskningsområde de sista decennierna. I den forskningen användes i början hela bakterier av *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) som injicerades systemiskt (aktiv immunisering). Effekten mättes i form av antikroppar i blod och saliv. Principen var densamma som för ett klassiskt vaccin: Genom att aktivera individens immunförsvar skapas ett »immunologiskt« minne. Det stora problemet med att vaccinera mot karies på detta sätt var svårigheten att kunna få ett tillräckligt bra och upprepat sekretoriskt svar (tillräcklig mängd av sIgA, sekretoriskt immunoglobulin A) som kunde skapa ett skydd i saliven. Det är nämligen i saliven och på tandytan som det måste bildas antikroppar mot *S. mutans*. Antikroppar som bildas i blodet (främst IgG) kan bara kan nå munhålan via läckage genom tandköttsfickan. Sådana antikroppar har också en kort livslängd och bryts snabbt ned i munnen.

Ett antal försök att öka intensiteten i det immunologiska svaret har gjorts och man har även prövat olika administrationssätt (till exempel subkutant, oralt och intranasalt) samt olika typer av adjuvans, immunstimulerande ämnen, så kallade understödjande medel (1). Det största hindret mot aktiv immunisering mot karies fann Hughes *et al.* De visade att immunisering med hela celler av *S. mutans* skapade korsreagerande antikroppar som angrep hjärtmuskelceller (2).

Utvecklingen inom detta forskningsfält har sedan dess riktats mot att försöka skapa ett specifikt immunsvaret genom att immunisera med mycket små delar av till exempel adhesionsproteiner som administreras lokalt, exempelvis nässpray (1). Att skapa en långvarig slemhinneimmunitet mot den kroppsegna mikrofloran som ju samtidigt är en viktig del av det icke-specifika immunsystemets skydd mot exogena infektioner är en svår nöt att knäcka och det saknas studier som visar att man lyckats skapa ett skydd mot karies hos människa via aktiv immunisering.

Lokal applicering av antikroppar (passiv immunisering) har rönt stor uppmärksamhet de sista två decennierna. Metoden har använts med stor framgång för att förhindra sjukdomar i mag-tarmkanalen (3). Det är en snabb och säker metod. Effekten fås lokalt (där antikropparna administreras) utan att immunsystemet påverkas. Antikropparna tas omhand på naturlig väg i mag-tarmkanalen. Nackdelen med passiv immunisering är att det krävs höga koncentrationer av antikroppar vilket gör att behandling blir dyr. Eftersom immunsystemet inte aktiveras skapas det inte heller något biologiskt minne. Det betyder att immuniseringen måste upprepas. Metoden bör därför snarare betraktas som en behandling än som ett vaccin (som ju skapar ett »livslångt« skydd). När det gäller skydd mot karies har man dock vi-

sat att effekten av passiv immunisering kan kvarstå upp till två år (4). En hypotes är att man genom att selektivt blockera vidhäftningen av en kariogen mutanstreptokock kan platsen fyllas av en mindre kariogen streptokock. Denna »switch« i mikrofloran skulle kunna skapa ett långvarigt skydd (5).

Det faktum att djur såväl som människor överför ett immunologiskt skydd via bröstmjölken till avkomman har utnyttjats vid framställning av polyklonala antikroppar. Värdjuret immuniseras och när immunsystemet aktiverats renas antikroppar fram från till exempel mjölk hos kor eller äggula från hönsägg.

Passiv immunisering mot karies och *S. mutans* har utvärderats i såväl djur- som humanstudier. Forskarna har använt immunoglobuliner från till exempel råmjölk och ägg samt antikroppar som framställts i tobakspanator (1) och av laktobaciller (6). En allmän strävan har varit att kunna framställa antikroppar med hög patientsäkerhet till så låg kostnad som möjligt.

### Karies och *Streptococcus mutans*

*S. mutans* är den bakterie som primärt orsakar karies (7). Nyckeln till att förstå *S. mutans* kolonisation av munhålan är kunskapen om hur olika molekyllära komponenter på bakteriens cellyta interagerar med salivpelliceln på tanden. Baserat på likheter i DNA delas mutansstreptokocker upp i sju olika arter. Varje art kan i sin tur delas upp i åtta olika serotyper. Genomet hos *S. mutans* har nyligen sekvenserats och visar sig bestå av 2 030 936 baspar (8). Det är kunskapen om genomets uppbyggnad och analyser utifrån detta som i framtiden kan ge forskarna värdefull insikt om hur *S. mutans* har anpassat sig för att överleva i den orala miljön.

*S. mutans* har på sin cellyta ett antal olika ytbundna strukturer (till exempel serotyp specifika polysackarider, glucosyltransferaser Gtfs), glukandbindande proteiner (GBP) och ytadhesionsprotein SAI/II (*surface adhesion I/II* också kallat Ag I/II, antigen I/II) (9, 10). Cellytemolekylerna spelar en viktig roll i bakteriens interaktioner med sin värdorganism och har blivit mycket uppmärksammade som potentiella vaccinkandidater. Dessa virulensfaktorer är starkt involverade i *S. mutans* förmåga att binda till salivpelliceln (tandytan) och överleva under perioder av svält och syrafall.

*Surface adhesion molecule* SAI/II är ett cellytebundet adhesin som är involverat i den initiala bindningen, vidhäftningen, av *S. mutans* till salivagglutininreceptorn i salivpelliceln (den receptor i salivpelliceln som har förmåga att sammanklumpa bakterierna) och anses spela en betydande roll vid kolonisationen i munhålan (11). (Detta protein har även kallats AgI/II, B, IF, P1, SR, MSL-1 och PAC (9).) SAI/II

har länge ansetts som ett av *S. mutans* viktigaste antigen och är en betydande virulensfaktor. Ett stort antal av de studier om aktiv och passiv immunisering mot karies som hittills har publicerats har handlat om antikroppar som riktar mot detta protein.

Ytterligare en viktig virulensfaktor med stor betydelse för *S. mutans* förmåga att kolonisera är glukosyltransferaserna; ett cellytebundet enzym, eller snarare enzymgrupp, som ansvarar för produktionen av glukand. Glukand är en extracellulär polysackarid som syntetiseras av *S. mutans* från glukos. *S. mutans*-streptokockerna använder glukand som energikälla vid svält och som ett sammanhållande »klister« på den glatta tandytan (12). Glukand finns i saliv och införlivas i den initiala salivpelliceln på tandytan. Väl på plats kan den verka för selektiv vidhäftning av mutanstreptokocker och spela en viktig roll vid bildandet av plack (13). Sammanfattningsvis är glukosyltransferaserna en mycket viktig virulensfaktor för *S. mutans* möjlighet att överleva och kolonisera tandytan.

### Karies och laktobaciller

Laktobaciller är en grupp grampositiva bakterier som använts för konservering och jäsning av mat i århundranden. Vissa stammar är naturliga delar i mag-tarmkanalens normalflora (14). Laktobaciller klassas som så kallade GRAS-organismer (*Generally regarded as safe*) och är inte sjukdomsframkallande. I dag kan man till exempel hitta dem i så kallad *functional foods* (exempelvis yoghurt). Ett flertal forskare anser att de kan förebygga infektioner som till exempel diarré och inflammatoriska tarmsjukdomar (15).

I munhålan har laktobaciller länge ansetts ha samband med karies på grund av att de upptäckts i kariöst dentin och att de producerar mjölksyra som kan påskynda kariesprocessen. I en nyligen utförd studie noterade man att laktobaciller som togs från kariesfria respektive kariesaktiva patienter skiljde sig märkbart. Laktobaciller från kariesaktiva patienter fäste lättare vid fuktiga ytor och hade en lägre produktion av ämnen som har en hämmande effekt på andra mikroorganismers tillväxt (16). På odlingsplatta kan *S. mutans* inte växa i närvaro av *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) utan det bildas en klar zon runt laktobacillerna (Fig. 1)(17). Man har med intresse noterat att *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) har förmåga att producera substanser med hög aktivitetshämmande effekt mot ett antal bakterier (inklusive *Streptococcus* spp) (18). Både laktobaciller och LGG anses konkurrera med streptokocker om så kallade orala adhesionsites. *In vitro* har man visat att LGG kan kolonisera munhålan tillfälligt och därmed minska tillväxten av *S. sobrinus* (19). Laktobaciller som isoleras från människa kan

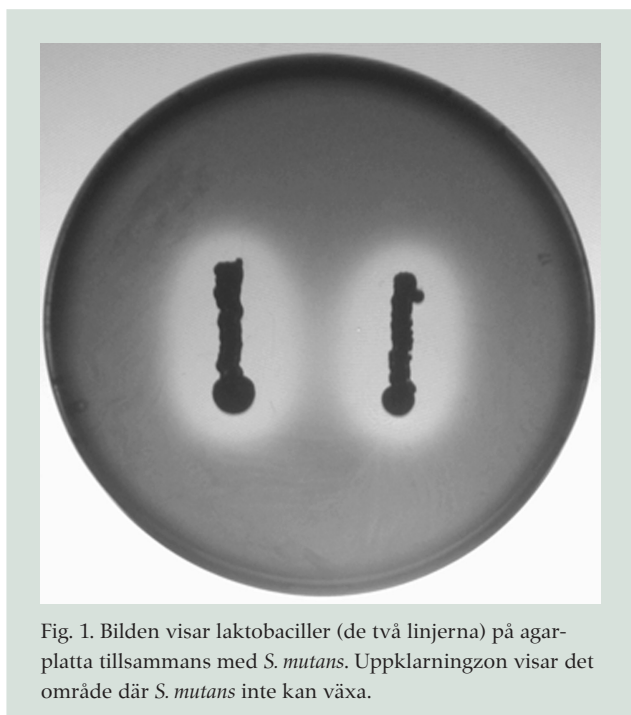


Fig. 1. Bilden visar laktobaciller (de två linjerna) på agarplatta tillsammans med *S. mutans*. Uppklaringszon visar det område där *S. mutans* inte kan växa.

även hämma produktionen av glukos från *S. mutans* (20). I en finsk studie fick barn på daghem mjölk som innehöll LGG i sju månader. Resultaten visade att de barn som fått LGG hade lägre kariesutveckling och färre antal *S. mutans* i slutet av studien (21).

Sammanfattningsvis är laktobaciller en stor och heterogen grupp bakterier som bör omvärderas även ur kariologisk synvinkel. Det har visat sig att laktobaciller skulle kunna användas som probiotika mot karies och i framtiden även andra sjukdomar i munhålan. När det gäller karies är det viktigt att använda en stam som producerar lägre mängd syra för att undvika progression av karies. Deras förmåga att producera bakteriehämmande substanser (så kallade bakteriociner) är ett mycket intressant forskningsfält och det faktum att de kan kolonisera munhålan gör dem till perfekta bärare av vaccin.

### Bovina antikroppar

Bovina antikroppar, antikroppar från ko, passerar via en aktiv transport från plasman till mjölken hos kor och finns i höga koncentrationer i djurens råmjölk (kolostrum) (3). Kons råmjölk kan innehålla 40–200 mg antikroppar/ml och har använts vid passiv immunisering mot ett antal patogener i mag-tarmkanalen (inklusive *S. mutans*). När kon immuniserats med antigen väntar man in immunsvaret. Djuret kan

sedan mjölkas på råmjölken som nu är rik på antikroppar. De första 5–6 mjölkningarna ger störst mängd antikroppar. Metoden kan upprepas flera gånger på samma ko men processen att rena fram antikroppar är fortfarande mycket arbetskrävande och kostsam.

*Michalek et al.* visade i studier på gnotobiotiska råttor att om vassla från immuniserade kor som injicerats med hela *S. mutans*-bakterier blandades i råttornas kost fick djuren en minskad kariesutveckling (22). Man har också visat att råmjölk från kor som immuniserats med både *S. mutans* och *S. sobrinus* kan hämma upptaget av glukos samt bildandet av både glukos och fruktan hos *S. mutans* (23). I försök på människa kunde man visa att hos individer som sköljde munnen med vassla blockerade antikropparna bindningen av *S. mutans* till experimentella salivpelliclar. Det stödde också humana leukocyters förmåga att ta upp och oskadliggöra främmande kroppar (fagocytos) (24) (till exempel ta död på *S. mutans*) samt minskade antalet *S. mutans* (25). I en nyligen publicerad artikel kunde man få fram bovina antikroppar som riktades mot ett syntetiskt protein som bestod av den salivbindande delen i PAC (SAI/II) och den glukosbindande delen i Gtf-I. Råttor som fick samma immunprodukt via födan visade en minskad kariesutveckling (26). Att kombinera två viktiga virulensfaktorer är ett intressant sätt att öka slagkraften hos ett vaccin.

Forskningen visar att bovina antikroppar eller råmjölksprodukter kan användas för passiv immunisering av människa eftersom de flesta individer tål mjölk. Redan nu säljs råmjölksprodukter från icke immuniserade djur i dagligvaruhandeln till exempel nyligen i tandkräm. Produkterna påstås skydda mot infektioner men innehåller inga riktade antikroppar.

### Antikroppar från ägg

Överföringen av immunitet från höna till kyckling via ägget beskrevs redan för mer än ett sekel sedan (27). Transporten av passiv immunitet mellan höna och kyckling sker via ett membran till gulan under äggets mognad (28). Exakt hur processen fungerar är fortfarande inte klarlagt. De immunoglobuliner eller antikroppar som utvinns från äggulan benämns IgY (29). Hos kor blir ökningen av antikroppshalterna efter immunisering ganska blygsam medan hönor kan hyperimmuniseras (30). Koncentrationen av IgY i äggula kan uppgå till 25 mg/ml. Under ett år kan en enda höna ge upp till 40 gram IgY. Detta gör naturligtvis äggantikroppar attraktiva för passiv immunisering. Kycklingantikroppar eller äggantikroppar har dock visat sig vara mindre stabila i miljöer med lågt pH (som till exempel i magsäcken). De är också mer känsliga för spjälkning av pepsin (28).

Antikroppar från ägg har använts vid passiv immunisering mot *S. mutans* och karies. Kariesutvecklingen minskade hos råttor som fick immunoglobuliner från hönor som immuniserats med hela celler av *S. mutans* (31). Försök har även gjorts på människa. Hos individer som fick skölja runt antikroppar i munnen minskade mängden *S. mutans* i saliv och plack i relation till den totala mängden streptokocker (28). Försök har också gjorts med kycklingantikroppar som riktades mot cellbundet Gtf. När man administrerade IgY via födan minskad kariestillväxten (1). Muntorra försöksdjur som gavs anti Gtf-antikroppar via dricksvattnet hade mindre mängd glattytekaries och fissurkaries jämfört med en kontrollgrupp (32). Resultatet visar att äggantikroppar kan fungera i en muntorr miljö och skulle vara en möjlig behandlingsstrategi för patienter med hög kariesaktivitet. Det har även framställts antikroppar mot ytterligare ett antigen hos *S. mutans*; glukansbindande protein, GBP. När dessa antikroppar gavs till råttor via födan kunde man se en minskad kariesutveckling i molarer (33).

Trots att stabiliteten hos IgY är lägre jämfört med humana och bovina antikroppar har de en potential som passiv immunisering mot karies tack vare tillgängligheten (ägg är en vanlig föda världen över) och dess höga koncentration av antikroppar. Trots det är passiv immunisering med äggantikroppar mot karies i dag en relativt dyr behandling. Att kunna öka »skörden« av antikroppar från varje ägg skulle göra dem attraktivare ur ekonomisk synvinkel.

### Monoklonala antikroppar

När det gäller monoklonala antikroppar mot *S. mutans* och karies finns omfattande forskning på både djur och människa. Monoklonala antikroppar har en ökad vidhäftningsförmåga och en högre specificitet än polyklonala antikroppar. Framställningen är exklusiv och kostsam och sker i cellkulturer. Denna typ av antikroppar används mest i laboratorieexperiment där det endast behövs en mycket liten mängd. I några uppmärksammade kariesstudier har dock lokal applicering av monoklonala anti-AgI/II-antikroppar hos Rhesusapor minskat mängden *S. mutans* på glatta ytor och i fissurer. Resultatet blev lägre kariesutveckling upp till ett år efter immunisering (34). Andra studier har visat att monoklonala antikroppar som riktas mot antigen B (SAI/II) hindrar inplantation av *S. sobrinus* hos råttor (35). I humanstudier applicerade *Ma et al.* monoklonala antikroppar mot AgI/II direkt på tänder och lyckades förhindra kolonisation av *S. mutans* (36). 1995 lyckades man klonas och uttrycka en monoklonal antikropp från mus riktad mot SAI/II i tobaksplanter (*Nicotina tabacum*) (37). Denna antikropp var unik eftersom den byggts upp av delar från en musantikropp men

med en sekretorisk del från kanin. De olika delarna sattes in i separata tobaksplanter. Därefter korsades plantorna och resultatet blev en sekretorisk växtantikropp. Tack vare den sekretoriska delen kunde växtantikroppen överleva 3 dagar jämfört med 1 dag för en IgG-antikropp (38). Växtantikroppen skyddade individer från rekolonisation av *S. mutans* under minst 4 månader sedan den tillförts lokalt (38). Det krävs dock stora mängder tobaksplanter för att utvinna antikroppar i den mängd som krävs för passiv immunisering mot karies. Men det är hisnande att föreställa sig att man i framtiden skulle kunna odla antikroppar i växter.

Hos lamadjur, dromedarer och kameler finns en unik uppställning antikroppar. Dessa antikroppar är motståndskraftigare mot värme och tål lågt pH (39). Den föränderliga delen av en sådan antikropp kallas VHH och är den minsta naturligt förekommande molekylen med antigenbindande egenskaper (40). VHH-fragment är lätta att klonas och kan uttryckas i både bakterier och svampar (41). De kännetecknas av både hög specificitet och affinitet (42). I en nyligen genomförd studie utvecklades ett rekombinerat fusionsprotein från llama VHH-fragment som riktades mot *S. mutans* som sammanfogats med Glucosoxidas (GOX). Detta VHH-GOX-protein kunde känna igen och binda *S. mutans* och även i låga koncentrationer oskadliggöra bakterien (43). GOX är ett enzym som ansvarar för produktionen av väteperoxid i närvaro av glukos och syre. Enzymet anses även kunna ha en bakteriedödande effekt (44). Generellt sett krävs det en bivalent struktur för att antikroppar ska klumpa samman bakterier och utverka sin effekt. Tidigare studier har visat att VHH inte kan verka som enskilda fragment eftersom den antigenbindande variabla delen inte ensamt klarar av att klumpa samman bakterier. Därmed förloras en viktig egenskap som gör VHH-fragment mer ineffektiva (45). Lokal applicering av VHH (eller VHH-GOX) gav överraskande nog en minskad utveckling av glattytekaries hos muntorra råttor. Vi kunde dock inte i våra studier visa att glukosoxidasenzymet har tilläggseffekt (46). De stora fördelarna med antikroppsfragment från Llama är deras stabilitet och storlek vilket gör dem högradigt intressanta för framtida forskning och användning.

### Laktobaciller som bärare av vaccin mot karies

Laktobaciller har i tidigare studier uttryckt immunstimulerande effekter på både slemhinnans och det systemiska immunsystemet (47). Laktobaciller är enkla att odla och ger höga koncentrationer till låg kostnad. Det har också varit möjligt att via genetisk omvandling uttrycka bitar av antigen på ytan av laktobaciller och på så sätt aktivera immunsystemet (48).

En vektor är en plasmid som innehåller genetisk information samt olika signaler som påverkar bakteriecellen så att den startar avläsning, produktion och exempelvis transport av ett visst protein till ytan. Plasmiden innehåller oftast någon form av markör för antibiotikaresistens för att möjliggöra selektiv odling av de omvandlade bakterierna. Om denna markör saknas kommer bakterien att göra sig av med sin »börda« (det »tillfogade« genetiska fragmentet) och produktionen av proteinet avbryts. Att vända på begreppet och istället uttrycka en antikropp på ytan av laktobacillen är inte möjligt på grund av antikroppmolekylens storlek. En vektor har nämligen ett mycket begränsat »utrymme« och kan bara uttrycka små proteiner. Den klassiska antikroppen är en bivalent struktur som består av tunga och lätta kedjan med den antigenbindande variabla delen, Fab, och den konstanta Fc-delen som fungerar som en signalflagga för andra aktörer i immunsystemet. Ett så kallat »single chain fragment« (scFv) består av enbart den antigenbindande delen av den lätta och tunga kedjan, sammanhållna av en så kallad linker. De skapas inte i naturen utan med molekylärbiologiska metoder. Vi har lyckats skapa genen för ett *single chain fragment* som är riktat mot SAI/II hos *S. mutans* och fått den att uttryckas på ytan av *Lactobacillus paracasei*. Den ursprungliga antikroppen är den monoklonala musantikropp som tidigare testats i både djurstudier och humanstudier (49). De transformerade laktobaciller som har scFv på ytan sammanklumpade *S. mutans* (Fig. 2) och när dessa laktobaciller gavs till muntorra råttor via dricksvattnet ledde det till en minskad utveckling av glattyttekaries (6).

Dessa resultat är unika på flera sätt. För första gången var det möjligt att uttrycka funktionella antikroppsfragment på ytan av mjölksyraproducerande laktobaciller. De föränd-

rade laktobacillerna ska kunna kolonisera munhålan tillfälligt och direkt på plats producera antikroppsfragment mot *S. mutans* och på så sätt förhindra karies. Det fortsatta arbetet med dessa så kallade transformanter har bland annat handlat om att byta ut och förbättra vissa delar av vektorerna. I en andra serie av expressionsvektorer ändrades den så kallade promotorn så att den gav ett konstant uttryck av scFv (till skillnad mot de första vektorerna som »kickades igång« av mannitol). Vi fann att även de nya transformanterna kunde uttrycka funktionella antikroppsfragment på ytan av *L. paracasei*. När de gavs till muntorra råttor minskade mängden karies. Kariesutvecklingen var också något lägre i jämfört med de laktobaciller som framställdes tidigare (17). Hypotesen har varit att *single chain*-antikropparna känner igen, binder och blockerar SAI/II och förhindrar på så sätt vidhäftning av *S. mutans* till tandytan.

Tack vare resultaten från experimentella modeller öppnas nya möjligheter. Våra laktobaciller har en väl utvecklad förmåga att sammanklumpa *S. mutans* och med ett antal scFv på cellytan kan det kanske få egenskaper som liknar bivalenta eller multivalenta antikroppar. Antikroppsfragmentet skulle också teoretiskt kunna fungera som en målsökare och binda laktobacillen till *S. mutans*. Därefter skulle produktionen av hämmande substanser oskadliggöra *S. mutans*. Detta är dock endast spekulationer. Mycket arbete återstår med att kartlägga mekanismen och vidareutveckla systemet.

Idag är det plasmidburna systemet för osäkert och innehåller resistensgener för antibiotika. Det gör att det inte lämpar sig för studier på människa. Nya metoder håller dock på att utvecklas. Det är fullt möjligt att välja ut en human stam av laktobaciller som har en låg produktion av mjölksyra som därmed kan utnyttjas för att förhindra progression av karies-

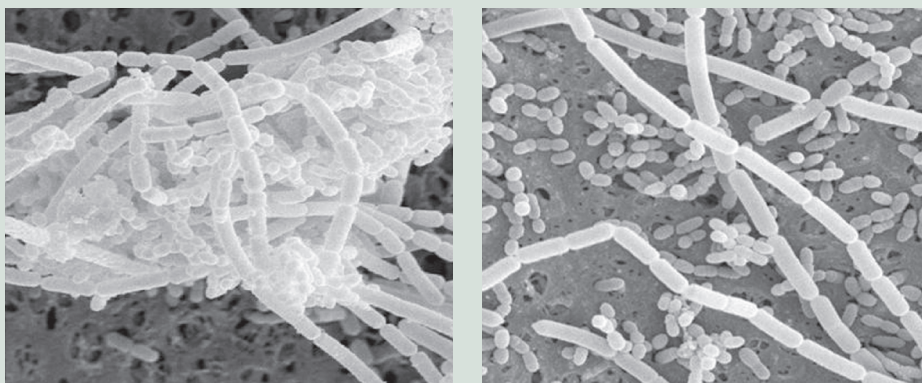


Fig. 2. Bild tagen i svepelektronmikroskop. På bilden visas laktobacillernas (stavformiga, avlånga) hopklumpning av streptokocker (korta runda).

utvecklingen. Kostnaden för ett sådant vaccin borde kunna bli lågt vilket ökar möjligheten för att en sådan behandling ska kunna nå ut till patienterna. Det ska dock nämnas att i dagsläget tycks acceptansen för genmanipulerade mikroorganismer vara låg hos befolkningen.

### Slutsats och framtida aspekter

Passiv immunisering har i tidigare studier visat sig vara en framgångsrik metod för att behandla och förebygga karies. Fördelarna med passiv immunisering är flera: Det är en snabb, lokal och säker metod med små risker för biefekter. Det sker ingen aktivering av immunsystemet vilket eliminerar risken för korsreagerande antikroppar. Endast ett fåtal studier har dock utförts på människa och effekter av metoden har enbart påvisats på bakteriell nivå och inte på kariesutvecklingen. Det krävs med andra ord mer forskning på området.

Karies orsakas av *S. mutans* men är en multifaktoriell sjukdom. Behandling och profylax mot kariesjukdom ska riktas mot samtliga faktorer där passiv immunisering utgör en möjlig väg gärna i kombination med traditionell terapi och profylax. Det ska ses som en riktad behandling mot kariesframkallande mutanstreptokocker. Patienter som lider av muntorrhet har en mer kariesrelaterad mikroflora (50) och strålningsbehandlade patienter utvecklar snabbt karies (51). Passiv immunisering i form av ett munsköljningspreparat skulle vara ett bra alternativ för muntorra patienter med skör munslemhinna. Med den kunskap vi har i dag skulle det troligen krävas ett flertal behandlingsperioder per år för en kariesaktiv patient. Själva behandlingen skulle dock kunna skötas av patienten själv i hemmet (i form av munsköljning eller sugtabletter).

Karies är ingen livshotande sjukdom och kostnaden för att utveckla ett vaccin mot karies måste sättas i proportion till det. Att framställa antikroppsbestyckade laktobaciller kan vara en framtida väg. Ännu återstår dock mycket arbete för att anpassa systemet för patientstudier. Morgondagens transformerade laktobaciller är redan på väg. Parallellt måste mekanismen hos de förändrade laktobacillerna kartläggas. Sökandet efter en optimal laktobacillkandidat för munhålan har redan inletts. Passiv immunisering som metod för att förebygga sjukdom kan också användas vid andra sjukdomar i munhålan som orsakas av mikroorganismer (till exempel infektion av *Candida albicans* och *Porphyromonas gingivalis*).

### English summary

#### *Passive immunisation against caries*

Adherence to mucosal surfaces has been shown to be of

great importance in the pathogenesis of various infections in the gastro-intestinal tract. In the oral cavity, adhesion to the tooth surface is important and plays a role in colonization of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). The oral pathogen *S. mutans* colonizes the hard tissue surfaces in the human oral cavity and is considered to be the principal etiologic agent of dental caries. *S. mutans* possesses a variety of virulence traits that enable it to establish itself in the oral cavity and initiate disease. Although the incidence of caries has been reduced due to prophylactic measures during the past decades, there are groups of patients for whom caries remains a major clinical problem. These include individuals with hyposalivation due to adverse effects of certain pharmaceutical products, systemic diseases such as Sjögren's syndrome, and head and neck tumor patients receiving heavy local irradiation therapy. The effects of passive immunization against *S. mutans*, has previously been explored using topical oral administration of antibodies derived from both animals and plants. This includes studies with both monoclonal and polyclonal antibodies directed against either the surface adhesion SAI/II or the Glucosyltransferases. Still, the passive immunization is expensive and new traits need to be explored in order to find a safe and cost-efficient therapy for oral diseases. *Lactobacilli* have previously been used to deliver vaccine components for active immunization in vivo. A novel method has been established where single-chain Fv (scFv) are produced in situ for delivery of passive immunity. Oral administration of scFv-expressing bacteria in desalivated rats resulted in less *S. mutans* bacteria and lower development of dental caries. *Lactobacilli* are easily cultured and a high concentration of bacteria is achieved. This could be a future strategy for passive immunization in the oral cavity but today tolerance in the society for GMO (gene modified microorganisms) is low.

### Referenser

1. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. *Vaccine* 2002; 20: 2027-44.
2. Hughes M, Machardy SM, Sheppard AJ, Woods NC. Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue. *Infect Immun* 1980; 27: 576-88.
3. Weiner C, Pan Q, Hurtig M, Borén T, Bostwick E, Hammarström L. Passive immunity against human pathogens using bovine antibodies. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 193-205.
4. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998; 4: 601-6.
5. Lehner T, Ma JK, Kelly CG. A mechanism of passive immunization with monoclonal antibodies to a 185,000 streptococcal antigen. *Adv Exp Med Biol* 1992; 327: 151-63.

6. Krüger C, Hu Y, Pan Q, Marcotte H, Hultberg A, Delwar D, et al. In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 702-6.
7. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50: 2594-600.
8. Adjić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *PNAS* 2002; 99: 14434-9.
9. Koga T, Yamashita Y, Nakano Y, et al. Surface proteins of *Streptococcus mutans*. *Dev Biol Stand* 1995; 85: 363-9.
10. Kuramitsu HK. Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 159-76.
11. Kelly CG, Evans P, Bergmeier L, Lee SF, Progulsk-Fox A, Harris AC, et al. Sequence analysis of the cloned streptococcal antigen I/II. *FEBS Lett* 1989; 258: 127-32.
12. Tanzer JM. Essential dependence of smooth surface caries on, and augmentation of fissure caries by sucrose and *Streptococcus mutans* infection. *Infect Immun* 1979; 25: 526-31.
13. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Quivey RG, Bowen WH. Interactions of streptococcal glucosyltransferases with -amylase and starch on the surface of saliva coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 291-8.
14. Ahrne S, et al. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 88-94.
15. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri I, Mykkanen H, Vesikari T. *Lactobacillus rhamnosus* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 399-404.
16. Ahumada Mdel C, Bru E, Colloca ME, Lopez ME, Nader-Macias MD. Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouths of patients with or without cavities. *J Oral Sci* 2003; 45: 1-9.
17. Krüger C, Hultberg A, Marcotte H, Ma JK, Hammarström L. Passive immunization by lactobacilli expressing single-chain antibodies against *Streptococcus mutans*. 2005 (Submitted).
18. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1231-3.
19. Meurman JH, Anttila H, Korhonen A, Salminen S. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 253-8.
20. Chung J, Ha ES, Park HR, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 214-6.
21. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 2001; 35: 412-20.
22. Michalek SM, Gregory RL, Harmon CC, Katz J, Richardson GJ, Hilton T, et al. Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1987; 55: 2341-7.
23. Loimaranta V, Tenovuo J, Virtanen S, et al. Generation of bovine immune colostrums against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* and its effect on glucose uptake and extracellular polysaccharide formation by mutans streptococci. *Vaccine* 1997; 15: 1261-8.
24. Loimaranta V, Carlen A, Olsson J, Tenovuo J, Syvaöja EL, Korhonen H. Concentrated bovine colostrum whey proteins from *Streptococcus mutans*/*Streptococcus sobrinus* immunized cows inhibit the adherence of and promote the aggregation of mutans streptococci. *J Dairy Res* 1998; 65: 599-607.
25. Loimaranta V, Nuutila J, Marnila P, Tenovuo J, Korhonen H, Lilius EM. Colostral proteins from cows immunized with *Streptococcus mutans*/*Streptococcus sobrinus* support the phagocytosis and killing of mutans streptococci by human leukocytes. *J Med Microbiol* 1999; 48: 917-26.
26. Mitoma M, Oho T, Michibata N, Okano K, Nakano Y, Fukuyama M, et al. Passive immunization with bovine milk containing antibodies to a cell surface protein antigen-glucosyltransferase fusion protein protects rats against dental caries. *Infect Immun* 2002; 70: 2721-4.
27. Klemperer F. Ueber natürliche Immunität und Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Arch Expl Pathol Pharmacol* 1893; 31: 365-82.
28. Hatta H, Ozeki M, Kim M, Yamamoto T, Hirasawa M, Otake S, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1997; 31: 268-74.
29. Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 1969; 130: 1337.
30. Butler JE. Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet Immunol Immunopathol* 1983; 4: 43-152.
31. Otake S, Nishihara Y, Makimura M, Hatta H, Kim M, Yamamoto T, et al. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J Dent Res* 1991; 70: 162-6.
32. Krüger C, Pearson SK, Kodama Y, Vacca Smith A, Bowen WH, Hammarström L. The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. *Caries Res* 2004; 38: 9-14.
33. Smith DJ, Shoushtari B, Heschel RL, King WF, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* 1997; 65: 4424-30.
34. Lehner T, Caldwell J, Smith R. Local passive immunisation by monoclonal antibodies against Streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. *Infect Immun* 1985; 50: 796-9.
35. van Raamsdonk M, de Soet JJ, de Graaff J. Effect of monoclonal antibodies on the colonization of rats by *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1993; 27: 31-7.
36. Ma JK, Hunjan M, Smith R, Lehner T. Specificity of monoclonal antibodies in local passive immunization against *Streptococcus mutans*. *Clin Exp Immunol* 1989; 77:331-337.
37. Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, Wang F, Stabila P, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 1995; 268: 716-9.
38. Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu

- L, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998; 4: 601-6.
39. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Bajana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light-chains. *Nature* 1993; 363: 446-8.
  40. Desmyter, A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L. Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J Biol Chem* 2001; 276: 26285-90.
  41. Frenken LGJ, van der Linden HJR, Hermans PWJ, Wil Bos J, Ruuls RC, De Geus B, et al. Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 2000; 78: 11-21.
  42. van der Linden RH, De Geus B, Frenken GJ, Peters H, Verrips CT. Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution. *J Biotechnol* 2000; 80: 261-70.
  43. Szynol A, de Soet JJ, Sieben-van Tuyl E, Bos JW, Frenken LG. Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3390-5.
  44. Thomas E, Milligan LTW, Joyner RE, Jefferson MM. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect Immun* 1994; 62: 529-35.
  45. Ma JK, Lehner T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 115-22.
  46. Krüger C, Hultberg A, Marcotte H, Frenken LGJ, Hammarström L. Passive immunization against caries using llama derived VHH fragments against *Streptococcus mutans*. 2005 (Submitted).
  47. Isolauri E, Joensuu J, Soumalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995; 13: 310-2.
  48. Pouwels PH, Vriesma A, Martinez B, Tielen FJ, Seegers JF, Leer R, et al. Lactobacilli as vehicles for targeting antigens to mucosal tissues by surface exposition of foreign antigens. *Methods Enzymol* 2001; 336: 369-89.
  49. Ma JK, Lehner T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. *Arch Oral Biol* 1990; 35: 115-22.
  50. Almståhl A, Wikström M. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion *J Dent Res* 1999; 78: 1410-6.
  51. Spak CJ, Johnson G, Ekstrand J. Caries incidence, salivary flow rate and efficacy of fluoride gel treatment in irradiated patients. *Caries Res* 1994; 28: 388-93.

## Författare

Carina Krüger, leg. tandläkare, MD

Institutionen för laboratoriemedicin, Karolinska Universitetssjukhuset, Huddinge, Sverige

## Korrespondens:

Leg. tandläkare, MD Carina Krüger, Institutionen för laboratoriemedicin, Karolinska Universitetssjukhuset, Huddinge, 141 86 Stockholm Sverige. E-mail: carina.kruger@labmed.ki.se