

ABSTRACT

Caries er en ikke-smitsom sygdom i de hårde tandvæv initieret af ubalance, dysbiose, i det orale økosystem og en funktionel modifikation af det dentale mikrobiom. Langvarigt indtag af en sukkerholdig diæt har betydelig effekt på mangfoldigheden i den orale mikrobiota, hvilket reducerer populationen af nogle bakterieslægter og -arter og øger mængden af andre. Syretolererende og syreproducerende bakterieslægter, såsom *Streptococcus*, *Scardovia*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces* og *Lactobacillus*, er biomarkører for sygdommen. Høj sukkereksponering fører til øget metabolisk aktivitet og til funktionelle ændringer i det dentale mikrobiom, hvis rumlige struktur er af afgørende betydning i cariesprocessen. Hos cariesaktive patienter har analyser påvist lokaliserede "virulens-hotspots" sammensat af flere bakteriearter arrangeret i en coronalignende struktur med en tæt indre kerne af *Streptococcus mutans*. Disse cirkulære hotspots skaber lokaliserede områder med meget lave pH-forhold ved biofilm/tandgrænsefladen, som hurtigt fører til demineralisering af tandens hårdtvæv.

EMNEORD Microbiome | dysbiosis | caries | dental biofilm



Korrespondanceansvarlig førsteforfatter:
SVANTE TWETMAN
stwe@sund.ku.dk

Hvad sker der i den dentale biofilm ved cariesaktivitet?

SVANTE TWETMAN, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

METTE ROSE JØRGENSEN, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

PERNILLA LIF HOLGERSEN, Department of Odontology, Section of Pediatric Dentistry, Umeå Universitet, Umeå, Sverige

► Accepteret til publikation den 22. maj 2023

[Online før print]

BAKTERIER FINDES PÅ NÆSTEN ALLE KROPSPENS OVERFLADER, på huden, på tænderne, i maven og i tarmene. Mikrobiota er et mikroskopisk økosystem, hvor mikroorganismer som svampe, virus og bakterier lever sammen i symbiose. Summen af mikroorganismene, deres genetiske information og det miljø, de befinder sig i, kaldes for mikrobiomet. Vi lever i symbiose med vores mi-

krobiom, og i løbet af de første leveår grundlægges forudsætningerne for et godt helbred og en god tandsundhed igennem barndommen og voksenlivet. Vores viden om disse forhold er øget de seneste år ved hjælp af de moderne molekylærbiologiske metoder. Næste generations sekventering (NGS) er i dag en almindeligt anvendt analysemetode inden for odontologien, og 16S-sekventering anvendes til at bestemme, hvilke bakterier der er til stede i en klinisk prøve (1). Sekventering indebærer, at man analyserer den genetiske kode ved at undersøge rækkefølgen af nukleotiderne ("bogstaverne") i DNA. Ved hjælp af computerkraft (bioinformatik) lægges overlappende sekvenser derefter sammen til genomets komplette DNA-sekvens, og et stort antal forskellige bakterier kan identificeres i samme prøve.

Det humane mikrobiom ændres langsomt igennem livet. Det tidlige mikrobiom giver barnet forudsætninger for en normal udvikling af bl.a. immunsystemet, centralnervesystemet og forskellige kognitive funktioner. Når barnet går over til fast føde, aktiveres gener i tarmmikrobiomet, som fører til, at maden kan nedbrydes og udnyttes. Fra skolealderen og op i voksenalderen er mikrobiomet relativt stabilt på individniveau, men sammenstillingen påvirkes af faktorer, der hænger sammen med ge-

Det orale mikrobiom

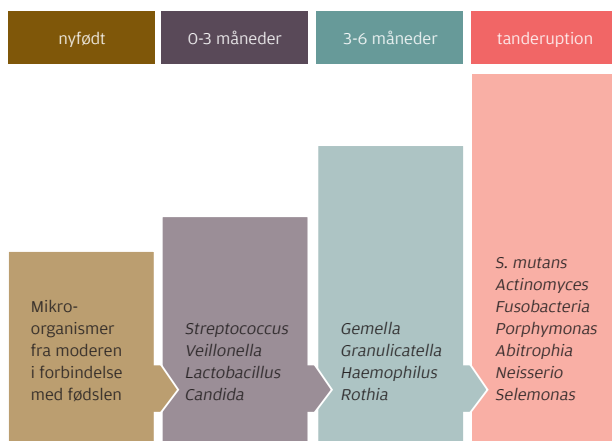


Fig. 1. Udviklingen af det orale mikrobiom i barnets første leveår. Artsrigdommen og kompleksiteten øges i takt med barnets kontakt med omgivelserne og tandfrembrud. Fra Ptasiwicz et al. 2022 (3).

Fig. 1. The development of the oral microbiome during the first year of life. The diversity and complexity increase with the child's external contacts and eruption of teeth. From Ptasiwicz et al. 2022 (3).

netik, kostvaner og livsstil. I de senere livsfaser er der tendens til, at mangfoldigheden igen mindskes. Lignende forandringer kan også påvises i det orale mikrobiom. Formålet med denne fokusartikel er i korthed at beskrive det orale mikrobiom og belyse, hvad der sker i den dentale biofilm ved cariesaktivitet.

Det orale mikrobiom

Der er bakterier omkring barnet allerede under graviditeten, og ved fødslen findes der et etableret mikrobiom i det nyfødte barns mundhule (2). Bakteriernes funktion er bl.a. at beskytte barnet og bidrage til omsætning af de stoffer, der kommer ind i barnets mund. Den første population af bakterier har gener for spaltning af mælkeproteiner, hvilket gør det muligt for barnet at få næring via modermælken. I de første døgn af barnets liv domineres det orale mikrobiom af streptokokker. Siden udvikles det kontinuerligt igennem de første leveår, og artsrigdommen tiltager, efterhånden som barnet eksponeres for bakterier fra omgivelserne. Barnets mundhule koloniseres med både sundhedsfremmende og sygdomsfremkaldende bakterier, først og fremmest fra den nærmeste familie.

Med stigende alder tilføjes det orale mikrobiom flere bakterier (Fig. 1), og de forskellige arter har forskellige funktioner. Nogle er afhængige af ilt/oxygen (aerobe), andre kan leve i både iltrige og iltfattige miljøer (fakultativt anaerobe), og atter andre overlever uden adgang til ilt (anaerobe). Bakterieslægter, som tilhører vores normale orale mikrobiom, er blandt andre *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacillus* og *Actinomyces* (3). Tandfrembruddet har stor økologisk indvirkning på sammensætningen af det orale mikrobiom, da der opstår nye niches i form af emaljeoverflader og tandkødschlommer. Bakterierne

har forskellige adhæsioner, som afgør, hvor de sætter sig fast, og omkring 20 % af alle bakterier i mundhulen findes på tænderne, hvor de danner den dentale biofilm (plakken). Plakken dannes kontinuerligt og består af polysakkarider og mikroorganismer. Plakkdannelsen er en dynamisk proces, hvor nogle bakterier sætter sig fast, mens andre løsrives og siden atter sætter sig fast. Forskellige typer af mikroorganismer konkurrerer om pladsen og næringsstofferne, men de beskytter også hinanden mod værtens immunforsvar og antimikrobielle substanser.

Den dentale biofilm, som sidder på de permanente tænder, har en højere andel af både Gram-positive og Gram-negative anaerobe arter end de primære tænder. Forskellene er særligt udtalte i den subgingivale plak (4). I forbindelse med puberteten øges kompleksiteten i biofilmen. De vigtigste stressfaktorer er hormoner og vækstfaktorer, som, i kombination med let lavintensiv inflammation, fører til en øget forekomst af vævsnedbrydende bakterier som fx *Prevotella*- og *Capnocytophaga*-arter. Efter puberteten kan disse bakteriers andel igen mindskes. I voksenlivet er det orale mikrobiom som regel stabilt, med mindre det udsættes for store økologiske forandringer. Aldring indebærer oftest, at mangfoldigheden mindskes i munden såvel som i resten af kroppen, og bakterier, som normalt er harmløse, kan give anledning til opportunistiske infektioner ved aldersrelaterede sygdomme og i forbindelse med medicinering og nedsat spyttproduktion. Fx ses forskellige typer af gærsvampe oftere hos ældre med mundtørhed og individer med svækket immunforsvar.

Symbiose og dysbiose

En artsrig oral biofilm med mange forskellige typer af funktionelle bakteriegrupper (cluster) er forbundet med god oral sundhed. Biofilmen er i så fald i symbiotisk balance, hvilket betyder, at den er relativt stabil og modstandsdygtig over for miljøpåvirkninger. De "gode" streptokokker (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*) dominerer i den dentale biofilm. Der findes også et fåtal patogene bakterier, men de gør ingen skade. Hvis biofilmen udsættes for ydre påvirkninger eller længevarende økologisk stress, forstyrres balancen, og bakteriesammensætningen ændres (5). Dette kaldes dysbiose og kan give anledning til sygdomme med ødelæggende konsekvenser. Caries er et resultat af en sådan pH-drevet dysbiose, som opstår, når et individ igennem længere tid eksponeres for en sød og klæbrig kost uden regelmæssig tandbørstning. Det sure miljø, som opstår i mundhulen, giver en økologisk fordel for syretolerante og syreproducerende bakterier, og andelen af disse øges derfor i den dentale biofilm (Fig. 2). Dette fører til en negativ spiral, hvor de syreproducerende bakterier gradvist indtager uforholdsmæssigt meget plads i biofilmen. Både antallet og andelen af disse mikroorganismer øges samtidig med, at deres funktion i biofilmen ændres. En høj sukkekonsponering trigger de syreproducerende bakteriers metaboliske aktivitet og forøger deres evne til at nedbryde sukker og stivelse fra kosten (6). Dette øger efterfølgende produktionen af syrer, som giver en sænkning af mundhulens pH-værdi, hvilket fører til demineralisering af emaljen og udvikling af caries. ▶

Fra symbiose til dysbiose

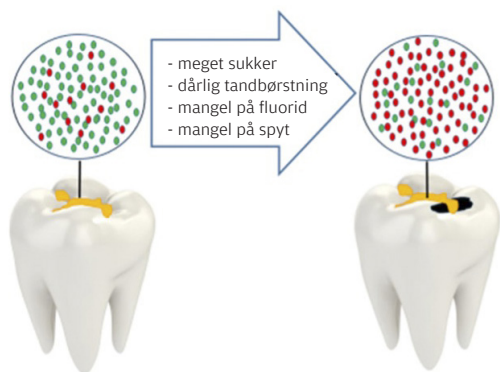


Fig. 2. Sammensætningen af den dentale biofilm skifter fra symbiose til dysbiose, når den "stresses" af uregelmæssig tandbørstning og højt sukkerindtag. Mangfoldigheden mindskes, og de syreproducerende og syretolerante bakterier (røde) vil dominere, hvilket fører til demineralisering af emaljen og udvikling af caries.

Fig. 2. The composition of the dental biofilm shifts from symbiosis to dysbiosis due to stress from excessive intake of sugars and irregular disruption (tooth brushing). Acid producing and acid tolerant bacteria (marked red) become abundant on expense of diversity. Eventually, this leads to demineralization of hard tissues and formation of caries lesions.

I den aktive cariesproces dominerer *S. mutans*, men flere andre syreproducerende bakterier er indblandet med en vis aldersvariation. Hos førskolebørn er fx *Scardovia wiggsiae*, *Slackia exigua*, *Granulicatella elegans* og *Candida albicans* stærkt koblet til tidlig og avanceret småbørnscaries (7,8). Individuer med kontinuerligt højt sukkerindtag i kosten (mad og drikke) udviser et tydeligt skifte i mundhulen mod en overrepræsentation af *Streptococcus*, *Scardovia*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces* og *Lactobacillus* (9). Omvendt vil en regelmæssig tandbørstning med fluorid tandpasta modvirke dysbiose og stimulere til en øget andel af ikke-cariogene, sundhedsrelaterede bakterier (10). Dette gælder også for cariesaktive individer og understreger vigtigheden af, at tandplejepersonalet via motiverende samtaler deltager aktivt i arbejdet med at reducere indtaget af frie sukkerarter.

Rod- og dentincaries adskiller sig fra emaljecaries ved, at disse typer hårdtvæv har et højere indhold af organisk matrix, og både acidogene og proteolytiske bakterier er involveret i den progressivt nedbrydende proces (11). *S. mutans* og undergrupper til *Actinomycetes*, som fx *Actinomyces viscosus serovar 2*, anses for at spille en stor rolle ved rodcaries. Laktobaciller kan ofte påvises inde i carieret dentin med lave pH-værdier; men det er ikke afklaret, om de spiller en ætiologisk rolle eller er en biomarkør for sygdommen (12). Det bør bemærkes, at nogle laktobaciller har en probiotisk effekt ved at producere bakteriociner som fx brintoverilte, som har en antagonistisk funktion i den dentale biofilm og kan bidrage til et sundhedsrelateret mikrobiom. Ved standset caries ses en tydelig reduktion i andelen af acidogene og aciduriske bakterier på den demineraliserede tandflade (13).

Virulens-hotspots

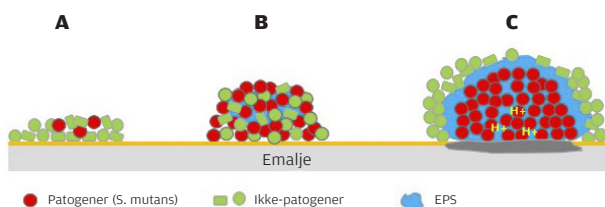


Fig. 3. Dannelsen af "virulens-hotspots" i den dentale biofilm, som forbindes med lokale cariesangreb. **A.** Blandet dental biofilm med et fåtal patogener. **B.** Overgang til dysbiose, hvor biofilmen opbygges af ekstracellulære polysakkarider (EPS) og en øget andel af caries-associerede bakterier. **C.** De syreproducerende bakterier ophobes i en rund struktur af EPS og beskyttes yderst af ikkepatogene bakterier. Her produceres store mængder syre (H⁺), som lokalt demineraliserer de hårde tandvæv. Billede af Eva Marie Reinwald fra Kim et al. 2020 (14).

Fig. 3. Formation of virulence-hotspots" in the dental biofilm, associated with the localized nature of caries lesions. **A.** Mixed dental biofilm with few pathogens (for example *S. mutans*), **B.** the biofilm shift to dysbiosis with a frame of extracellular polysaccharides (EPS) and an increased proportion of caries-associated acid-producing bacteria. **C.** The acid-producing bacteria are concentrated in a "rotund" structure covered by EPS and protected by an outer layer of non-pathogens. In these hotspots, large amounts of acids (H⁺) are produced, causing a localized demineralization of the enamel. Redrawing by Eva Marie Reinwald from Kim et al. 2020 (14).

Rumlige struktur

Biofilmens mikrobielle sammensætning alene giver ikke et fyldestgørende billede af dysbiosen; plakkens rumlige struktur har også stor betydning. Den viser, hvor i biofilmen forskellige typer af bakterier er lokaliseret, og hvordan de er orienteret i forhold til hinanden. Sådanne analyser har vist, at en specifik "coronalignende" struktur i den supragingivale plak ofte ses hos cariesaktive individer (14). En ydre skal af forskellige ikkepatogene organismer dækker over en indre kerne, som domineres af en tæt population af *S. mutans* (Fig. 3). Under den yderste skal ligger et lag af ekstracellulære polysakkarider, som hænger sammen og beskytter strukturen. Disse runde strukturer skaber lokale mikromiljøer, såkaldte "virulens hotspots", med meget lave pH-værdier (4,0-4,5), som hurtigt forårsager lokale afkalkninger af tandens hårdtvæv. Dette forklarer også det kliniske billede ved tidlige carieslæsioner, som typisk ikke er jævnt fordelt over tandfladen, men optræder lokaliseret. Disse hotspots skal fjernes med regelmæssige intervaller, og den mekaniske mundhygiejne i form af tandbørstning morgen og aften samt brug af tandtråd hos større børn og voksne spiller en central rolle.

DISKUSSION

Det er kun ca. 50 % af den orale mikrobiota, som kan dyrkes med konventionelle teknikker, og hele 32 % beskrives som "viable but not cultivable" (VBNC). Det betyder, at bakteriecellerne lever, men ikke kan dyrkes i et laboratoriemiljø eller i noget kendt dyrkningsmedium (15). De moderne molekylærbiologiske teknikker har derfor udvidet perspektivet omkring cariesygdommens ætologi og biologi. Man bør dog også kende

til teknikernes begrænsninger. 16S-rRNA-sekventering kan "kun" identificere den bakterielle sammensætning på slægts- og artsniveau og giver ingen information om de forskellige stammer og deres funktionelle kapacitet. Dette er en ulempe, eftersom der er stor variation mellem de forskellige stammers egenskaber og virulens inden for samme familie (16). En ny metode til analyse af bakteriernes funktionalitet i biofilmen er metabolomet, som analyserer metabolitter, der er relateret til forskellige fænotyper i biofilmen (10). En anden metode er proteomet, hvor proteiner identificeres og kvantificeres i fx en salivaprøve. Derved bliver det muligt at studere, hvordan proteinprofilerne fra individer med og uden caries adskiller sig. Både metabolom- og proteomanalyser er lovende metoder til fremtidig cariesdiagnostik.

Prøvetagningsteknikken kan også være af betydning ved undersøgelser af den orale mikrobiota. Salivaprøver anvendes ofte af praktiske årsager som en afspejling af det orale mikrobiom (tænder, slimhinder, tunge, svælg), men saliva er ikke fuldkommen repræsentativ for sammensætningen af det dentale mikrobiom. For at kunne studere den dentale biofilms rumlige struktur kræves prøvetagningsteknikker og analysemetoder, som ikke forstyrrer biofilmens tredimensionelle biogeografi (17). Desuden er plakprøver mere tidskrævende og vanskeligere at indsamle på en reproducerbar måde over tid, hvilket begrænser mulighederne for at indsamle større mængder materiale under "feltmæssige" forhold.

Forskningsundersøgelser design har også betydning for, hvordan resultaterne kan tolkes. De fleste undersøgelser af det orale mikrobiom og caries er udført som tværsnitsstudier af case-kontrol-typen, hvor cariesfrie børn og børn med forskellige grader af caries er undersøgt ved hjælp af salivaprøver. Disse undersøgelser giver vigtig information om sammenhængen

Klinisk relevans

De moderne molekylærbiologiske metoder har givet nye perspektiver på den dentale biofilms sammensætning, funktion og struktur ved aktiv caries og kan give indikationer på, hvordan sygdommen kan forebygges på en langtidsholdbar måde.

mellem cariesaktivitet og diverse bakterier, og det er åbenlyst, at slægter som *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia* og *Actinomyces* er betydelige biomarkører, som kan anvendes i prædiktive modeller. Til belysning af årsagssammenhænge er det imidlertid påkrævet at foretage prospektive studier med gentagne prøvetagninger, som kan påvise lokale ændringer i den dentale biofilm, inden sygdommen opstår. Der er publiceret enkelte sådanne kohortestudier omkring tidlig småbørnscaries, og nye genetiske og epigenetiske risikofaktorer er blevet identificeret (18). Der mangler i høj grad tilsvarende information vedrørende caries hos voksne, heriblandt i relation til udvikling af rodcaries. Der er således behov for yderligere klinisk forskning til undersøgelse af, hvad der sker i biofilmen omkring tanden og i den demineraliserede tandsubstans ved cariesaktivitet, samt hvad der styrer begivenhederne.

KONKLUSION

Nye analysemetoder af den dentale biofilms sammensætning, funktion og rumlige struktur har øget vores forståelse af cariesprocessen. Opretholdelse af symbiose og afvikling af dysbiose hos cariesaktive patienter er centrale koncepter for en langtidsholdbar behandling af sygdommen. ♦

ABSTRACT (ENGLISH)

WHAT HAPPENS IN THE DENTAL BIOFILM DURING CARIES ACTIVITY?

Caries is a non-communicable disease initiated by imbalance, or dysbiosis, of the oral ecosystem and a pH-driven functional modification of the dental microbiome. Long-term consumption of a high-sugar diet has a significant effect of the diversity of the oral microbiota, decreasing the population of some genera and species and increasing the abundance of others. Acid-tolerating and aciduric genera such as *Streptococcus*, *Scardovia*, *Veillonella*, *Rothia*; *Actinomyces* and *Lactobacillus* are biomarkers of the disease. Functional

alterations in the dental microbiome are evident as the sugar exposure triggers pathways increasing the metabolic activity. The spatial structure of the microbial community is of pivotal importance. Analyses have detected localized "virulence hotspots" in caries-active patients. Such communities are composed of multiple species arranged in a corona-like structure with a dense inner core of mutans streptococci. Rotund communities create localized regions of highly low pH conditions at the biofilm/tooth interface that is associated with enamel demineralization.

LITTERATUR

1. Zaura E, Pappalardo VY, Buijs MJ et al. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: A practical guide for planning, performing, and reporting. *Periodontol 2000* 2021;85:210-36.
2. Lif Holgerson P, Esberg A, Sjödin A et al. A longitudinal study of the development of the saliva microbiome in infants 2 days to 5 years compared to the microbiome in adolescents. *Sci Rep* 2020;10:9629.
3. Ptasiwicz M, Grywalska E, Mertowska P et al. Armed to the teeth – The oral mucosa immunity system and microbiota. *Int J Mol Sci* 2022;23:882.
4. Kaan AMM, Kahharova D, Zaura E. Acquisition and establishment of the oral microbiota. *Periodontol* 2000 2021;86:123-41.
5. Pitts NB, Twetman S, Fisher J et al. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J* 2021;231:749-53.
6. Esberg A, Eriksson L, Hasslöf P et al. Using oral microbiota data to design a short sucrose intake index. *Nutrients* 2021;13:1400.
7. Fakhrudin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis* 2019;25:982-95.
8. Xiao J, Huang X, Alkhers N et al. *Candida albicans* and early childhood caries: A systematic review and meta-analysis. *Caries Res* 2018;52:102-12.
9. Angarita-Díaz MDP, Fong C, Bedoya-Correa CM et al. Does high sugar intake really alter the oral microbiota?: A systematic review. *Clin Exp Dent Res* 2022;8:1376-90.
10. Carda-Diéguez M, Moazzez R, Mira A. Functional changes in the oral microbiome after use of fluoride and arginine containing dentifrices: a metagenomic and metatranscriptomic study. *Microbiome* 2022;10:159.
11. Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries. *Caries Res* 2016;50:422-31.
12. Wen ZT, Huang X, Ellepola K et al. Lactobacilli and human dental caries: more than mechanical retention. *Microbiology (Reading)* 2022;168:001196.
13. Zhang JS, Chu CH, Yu OY. Oral microbiome and caries development. *Dent J (Basel)* 2022;10:184.
14. Kim D, Barraza JP, Arthur RA et al. Spatial mapping of polymicrobial communities reveals a precise biogeography associated with human dental caries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117:12375-86.
15. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:137-43.
16. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK et al. Biology of oral streptococci. *Microbiol Spectr* 2018;6. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
17. Valm AM. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol* 2019;431:2957-69.
18. Peres KG, Nascimento GG, Gupta A et al. Scoping review of oral health-related birth cohort studies: Toward a global consortium. *J Dent Res* 2022;101:632-46.