

## Oorspronkelijke bijdragen

# De nieuwe strijd tegen mutans streptokokken

M.M.E. Straetemans  
C. van Loveren

**Samenvatting.** Mutans streptokokken zijn een belangrijke oorzaak van het ontstaan van cariës. Met moleculair biologische technieken worden nieuwe wegen geëxploreerd om deze bacteriën te bestrijden. Een van de strategieën is het genetisch modificeren van mutans streptokokken zodat deze minder cariogeen zijn. Zuurproductie en productie van intracellulaire polysacchariden kunnen worden uitgeschakeld. Maar het is nog onduidelijk of deze minder cariogene mutanten de plaats van de normale mutans streptokokken in de plaqueflora kunnen innemen. Immunisatie is een andere route om mutans streptokokken te onderdrukken. Antilichamen, gericht tegen eiwitten die betrokken zijn bij de hechting van mutans streptokokken aan tandoppervlak, kunnen worden opgewekt door actieve immunisatie. Het is ook mogelijk antilichamen op te wekken in koerserum, -melk, kippeneieren en zelfs tabaksplanten. Na isolatie kunnen deze antilichamen lokaal worden geapliceerd. Met deze nieuwe technieken kan in de toekomst wellicht cariës voorkomen of geremd worden. De weg naar commerciële toepassing is echter nog lang en er zullen nog vele obstakels overwonnen moeten worden.

STRAETEMANS MME, LOVEREN C VAN. De nieuwe strijd tegen mutans streptokokken. Ned Tijdschr Tandheelkd 1997; 104: 370-2.

Uit de vakgroep Cariologie,  
Endodontologie en Pedodontologie van  
het Academisch Centrum  
Tandheelkunde Amsterdam (ACTA).

Trefwoorden: Cariës - Microbiologie -  
Mutans streptokokken

Datum van acceptatie: 6 juli 1997.

Adres: Dr. C. van Loveren,  
ACTA, Louwesweg 1,  
1066 EA Amsterdam.

## 1 Inleiding

Cariës is een multifactorieel proces. Een belangrijke factor bij het ontstaan zijn de mutans streptokokken, die uit fermenteerbare suikers zuur produceren dat zorgt voor demineralisatie en laesieontwikkeling. Nu nog beperkt de strijd tegen mutans streptokokken zich tot mondreiniging, het gebruik van antimicrobiële middelen en vermindering en vervanging van suikers in het dieet.

Sinds het beschikbaar komen van moleculair biologische technieken zijn meer dan 40 genen van de mutans streptokokken bekend geworden. Dit heeft geleid tot nieuwe inzichten in de virulentie en de cariogeniteit van mutans streptokokken en een hele nieuwe benadering van cariëspreventie wordt geëxploreerd.<sup>1</sup> In dit artikel wordt een globaal overzicht gegeven van deze exploratie (tab. I). Het betreft vooral het vervangen van mutans streptokokken door minder cariogene mutanten en immunisatie tegen mutans streptokokken.

## 2 Minder cariogene mutanten in de tandplaque?

Met moleculair biologische technieken is het in principe mogelijk de bacterie zelf aan te pakken. Wil je niet dat mutans streptokokken zuur produceren? Dan 'maak' je er gewoon een die dit niet kan. Het voornaamste zuur dat uit suiker geproduceerd wordt is melkzuur. Het hiervoor verantwoordelijke enzym is het lactaatdehydrogenase. Onderzoekers hebben in het DNA van de bacterie het gen dat codeert voor dit enzym opgespoord en uitgeschakeld, zodat zuurproductie niet meer mogelijk is.

Het is echter niet mogelijk om dit zonder verdere gevolgen te doen. De enzymatische reactie waarbij melkzuur wordt gevormd, is namelijk een energie-leverende stap en cruciaal voor het overleven van de bacterie. Overleving is belangrijk omdat het de bedoeling is dat de mutant in de tandplaque wordt teruggeplaatst waarna hij de aanwezige mutans streptokokken geheel of gedeeltelijk moet vervangen. Men noemt dit 'replacement therapy'. Door deze vervanging zal de capaciteit van de zuurproductie van

de tandplaque en dus de cariogeniteit afnemen.

De oplossing voor het energieprobleem is gevonden in het vervangen van het lactaatdehydrogenase in de mutans streptokokken door een alcoholdehydrogenase, afkomstig uit *Zymomonas mobilis*, een bacterie die weinig of geen zuur produceert maar in plaats daarvan alcohol.<sup>2</sup> Hierdoor is de mutansmutant in staat energie te genereren voor zijn metabole processen, terwijl de zuurproductie is uitgeschakeld ten gunste van de productie van ethanol. Replacement-experimenten met deze stammen zijn echter nog niet gepubliceerd.

Een andere mogelijkheid is de zuurproductie te verminderen door het uitschakelen van het vermogen van mutans streptokokken om intracellulaire polysacchariden (IPS) te produceren. Deze IPS zijn glycogeenachtige verbindingen die gemaakt worden wanneer er voldoende voeding voor de bacterie aanwezig is. De gedachte is dat het IPS tussen voedingsmomenten in als voedingsvoorraad fungeert en wordt afgebroken waarbij zuur wordt geproduceerd (verlengde zuurstoot). Inmiddels is aangetoond dat IPS-deficiënte mutanten inderdaad minder cariogeen zijn, maar replacement-experimenten zijn nog niet uitgevoerd.<sup>3</sup>

Bij al dit soort benaderingen is het, zoals eerder opgemerkt, van belang ervoor te zorgen dat andere eigenschappen zoals hechting en groeikarakteristieken niet worden aangetast. Anders is het nog maar de vraag of de reeds aanwezige mutans streptokokken 'vervangen' kunnen worden door mutanten. Ze zullen zich niet zomaar laten 'wegpesten' uit een gevestigde plaque. Als vervanging niet werkt, zou gedacht kunnen worden aan het laten vestigen van de mutante stammen in kinderen die nog geen mutans streptokokken hebben, dus vóór het zogenaamde 'window of infectivity'.<sup>4</sup> Dit 'window' is een relatief kort tijdsbestek tussen de leeftijd van 19 en 31 maanden waarin een groot gedeelte van de kinderen mutans streptokokken krijgt na contact met speeksel van anderen, dikwijls dat van de moeder. Het is echter de vraag of dit soort preventieve maatregelen toelaatbaar zijn. Het is immers nog onduidelijk wat de gevolgen van het 'implanteren' van genetisch gemodificeerde micro-organismen zijn voor de orale ecologie en de rest van het lichaam.



### 3 Immunisatie

#### 3.1 Werkingsprincipe

Een virulentiefactor van mutans streptokokken is de mogelijkheid zich blijvend in de mond te vestigen door aan hard tandweefsel te hechten. Een belangrijke rol hierbij spelen de *glucosyltransferasen*. Dit is een groep enzymen aan het celoppervlak van mutans streptokokken die uit sacharose lange plakkerige polymeren (glucanen) synthetiseert. Verder zijn ook celoppervlakte-eiwitten, zoals antigeen I/II betrokken bij de hechting. Door antigeen I/II zijn mutans streptokokken in staat selectief aan de pellicel op de tand te hechten. Of antigeen I/II belangrijk is in de virulentie van mutans streptokokken is echter de vraag, aangezien mutante stammen zonder antigeen I/II makkelijk kunnen binden aan met glucaan bedekte oppervlakken.<sup>5</sup> Replacement met in bindingseigenschappen-mutante stammen is niet aan de orde, omdat deze stammen slecht aan het tandoppervlak hechten en dus niet de plaats van de gewone wild-type mutans streptokokken kunnen innemen.

Moleculair biologisch onderzoek aan glucosyltransferases en antigeen I/II heeft de werking van deze eiwitten in kaart gebracht. De functie van de verschillende actieve gedeelten van deze eiwitten, zoals bindingsplaatsen, zijn opgehelderd, waardoor het mogelijk is tegen deze zo klein mogelijke epitopen (in tegenstelling tot het hele eiwit of zelfs hele cellen) antilichamen op te wekken. Hierdoor kan de activiteit van deze eiwitten en daardoor de hechting aan het tandoppervlak van mutans streptokokken geblokkeerd worden. De retentie in de mond van cariogene streptokokken wordt op deze wijze geremd, zodat het aantal ervan en daarmee de totale zuurproductie omlaag gaat. Vandaar dat veel onderzoek wordt gedaan naar de mogelijkheid tot immunisatie om te voorkomen dat kolonisatie optreedt. Er is echter enige terughoudendheid in het toepassen van vaccins geboden. Gezien het niet-levensbedreigende karakter van de infectieziekte cariës moeten de vaccins niet alleen heel effectief zijn, maar ook helemaal veilig. Er kan onderscheid gemaakt worden in *actieve* en *passieve* immunisatie.

#### 3.2 Actieve immunisatie

*Actieve* immunisatie kan bestaan uit het inenten van mutans streptokokkenpreparaten. Eind jaren zestig zijn apen geïmmuniseerd met hele cellen hetgeen tot gevolg had dat er na 18 maanden aanzienlijk minder cariës ontstond dan in een controlegroep. De geïmmuniseerde apen ontwikkelden 6 caviteiten en 4 vroege laesies tegenover 38 caviteiten en 13 vroege laesies in de niet-geïmmuniseerde dieren. Er is later bezorgdheid ontstaan over de kruisreactiviteit van streptokokkenantigenen met hart- of nierweefsel.<sup>6</sup> Het omzeilen van kruisreactiviteit was de reden om te zoeken naar de kleinste mogelijke stukjes eiwit van antigeen I/II en glucosyltransferase waartegen antilichamen opgewekt kunnen worden die nog actief zijn. Ook werden synthetisch mutans-streptokokkeneiwitten gemaakt. Door een zorgvuldige samenstelling was het mogelijk de immunoreactie te versterken en de kans op kruisreactiviteit te verkleinen. Toedienen van synthetische mutans-streptokokkeneiwitten, afgeleid van celwand-eiwitten en glucosyltransferasen, heeft respectievelijk in apen en ratten zijn beschermende werking bewezen.<sup>7,8</sup>

Een probleem van de immunisatie per os is de snelle afbraak van de antigenen door allerlei enzymen in de mond en het maag-darmkanaal. De oplossing voor dit probleem is gevonden in het koppelen van antigeen aan een stof die goed hecht aan lymfocytcellen, waardoor een lange contacttijd wordt gewaarborgd. Een andere oplossing is een antigeen te

Tabel 1. De nieuwe strijd tegen mutans streptokokken.

#### 1. Replacement therapy:

- Het vervangen van mutans streptokokken door minder cariogene mutanten:
- Mutans streptokokken zonder lactaathydrogenase vormen geen melkzuur
  - IPS-deficiënte mutanten voorkomen verlengde zuurstoot

#### 2. Actieve immunisatie:

- Patiënt vormt zelf antilichamen
- Effectiever en veiliger door:
- kleinere epitopen (antigenen)
  - synthetische mutans-streptokokkenepitopen
- Effectiever door verlengen van contacttijd met epitoot door:
- epitoot te koppelen aan een hechtstof aan lymfocytweefsel
  - epitopen te laten maken door darmflora

#### 3. Passieve immunisatie door lokale applicatie van antistoffen opgewekt in:

- Koemelk en -serum
- Dooiers van kippeneieren
- Transgene tabaksplanten

laten maken door niet-virulente bacteriën, die goed in de darm kunnen overleven zoals *Salmonella typhimurium*.<sup>6</sup> Op deze wijze worden in de darm continu mutans-streptokokkenantigenen geproduceerd en een continue immunerespons geïnduceerd.

#### 3.3 Passieve immunisatie

Behalve actieve immunisatie, kan ook *passieve* immunisatie plaatsvinden. Er worden hierbij rechtstreeks antilichamen geapliceerd op de plek waar ze nodig zijn. Deze antilichamen moeten dan wel eerst opgewekt worden in een ander organisme dan de mens. Door zo het eigen immuunsysteem te omzeilen, is de kans op bij-effecten kleiner. Het betekent wel dat de antilichamen steeds opnieuw toegediend moeten worden, omdat diegene die ze gebruikt niet zelf gestimuleerd wordt antilichamen te maken zoals dat bij actieve immunisatie gebeurt. De antilichamen moeten zodoende verwerkt worden in een tandpasta of een mondspoelmiddel.

De antilichamen tegen mutans streptokokken voor passieve immunisatie kunnen bijvoorbeeld gehaald worden uit serum en melk van systemisch geïmmuniseerde koeien, uit de dooiers van eieren van geïmmuniseerde kippen en zelfs uit transgene tabaksplanten. Deze laatste bieden aantrekkelijke voordelen, omdat door kruising van de planten 'optimale' antilichamen kunnen worden gekweekt. Verder kunnen antilichamen uit planten heel goedkoop gemaakt worden. Dit is belangrijk aangezien ze dagelijks gebruikt moeten worden.

Voordat het zover is, zijn er nog veel obstakels te overwinnen. Over de werkzaamheid van antilichamen in een tandpasta, lak of vernis is nog niets bekend. Als antilichamen in spoelmiddelen worden gebruikt, worden ze sterk verdund en zullen ze (te) snel uit de mond verdwijnen. Bovendien zijn de antilichamen zo groot dat diffusie in de tandplaque langzaam is. Hierdoor wordt het effect beperkt. Desalniettemin is verder onderzoek naar de mogelijkheden van passieve immunisatie interessant vanwege de specifieke werking, waaraan het de huidige antimicrobiële middelen ontbreekt.



## Literatuur

- 1 Russell RRB. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res* 1994; 28: 69-82.
- 2 Brooks TA, Hillman JD. Construction and characterization of a caries replacement therapy effector strain. *J Dent Res* 1997; 76 (spec issue; abstract 708):102.
- 3 Spatafora Harris G, Michalek SM, Curtiss R. Cloning of a locus involved in *Streptococcus mutans* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun* 1992; 60: 3175-85.
- 4 Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993; 72: 37-45.
- 5 Bowen WH. Vaccine against dental caries - a personal view. *J Dent Res* 1996; 75: 1530-3.
- 6 Mandel ID. Caries prevention: Current strategies, new directions. *J Am Dent Assoc* 1996; 127: 1477-88.
- 7 Lehner T, Haron J, Bergmeir LA, et al. Local oral immunization with synthetic peptides induces a dual mucosal IgG and salivary IgA antibody response and prevents colonization of *S. mutans*. *Immunology* 1989; 67: 419-24.
- 8 Smith DJ, Taubman, MA, Holmberg CF, Eastcott J, King WF, AliSalaam P. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic peptide derived from a glucan-binding domain of mutans streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* 1993; 61: 2899-905.

## Summary

### THE NEW BATTLE AGAINST MUTANS STREPTOCOCCI

Key words: Dental caries – Molecular biology – Mutans streptococci

Mutans streptococci are an important factor in the aetiology of dental caries. New ways of combating these bacteria have become available with the development of molecular biological techniques. One of these strategies involves the genetic modification of mutans streptococci to develop less cariogenic mutants. Acid production and the production of intracellular polysaccharides have been eliminated. But it is not clear yet whether these less cariogenic mutant strains are able to replace the normal mutans streptococci in dental plaque. Immunization is another possibility to suppress mutans streptococci. Antibodies against proteins involved in adherence of mutans streptococci have been raised by active immunization. It is also possible to raise antibodies in cow serum and milk, in eggs of chickens and even in tobacco plants. After isolation, these antibodies are to be applied topically. In the future, these new strategies may prevent or reduce caries. However, further research is necessary to resolve the obstacles on the way to commercial application.

## Uit de historie

### Uit 'Caries Problemen. De Caleidoscoop der Cariesfactoren' door C.H. Withaus.

'Gelijk bekend, heeft zich de tandcaries sinds een eeuw uitgebreid als een plaag, die de cultuurvolkeren gelijk een lawine overvalt. Geen enkele ziekte tast zooveel menschen aan, als zij, en geen orgaan wordt zoo vroegtijdig min of meer buiten functie gesteld, als het gebit van den cultuurmensch. Tegenover het gemis aan genees- en herstelactie van het organisme heeft de tandheelkunde haar gecompliceerde herstelactie gesteld, ten koste van veel inspanning der tandartsen en met het offer van geduld en goed der geteisterden. Een vermindering, laat staan een preventie der caries is nog niet bereikt. *Ik ben echter overtuigd, dat deze wel bereikbaar is, daar de oorzaken thans duidelijk vastgesteld kunnen worden.* De preventie had al een halve eeuw eerder ingevoerd kunnen worden, als niet Miller's theorie, na aanvankelijke toestemming, later steeds opnieuw in twijfel getrokken was. Dit was het gevolg van het groote aantal factoren, die op het ontstaan der caries invloed hebben, of die men er ten onrechte mee in verband brengt. Hieromtrent moeten de tandartsen tot overeenstemming geraken; het onderzoek der laatste jaren, te bevestigen en aan te vullen door een groot aantal nauwkeurige proeven, moet daartoe leiden.

[...]Door het onderzoek van de gebitten onzer voorouders en der primitief levende volken met oorspronkelijke voeding, en van den verassend snelle overgang van geheele caries-vrijheid naar algemene gebits-vernietiging, alleen door overname van de kost der civilisatie, is de *chemisch-parasitaire cariestheorie van Miler schitterend bevestigd*. Hiermede is de weg geopend voor caries-prophylaxis. Als er één natie, na behoorlijk onderzoek, de productie en den verkoop van sterk cariesverwekkende voedings- en genotsmiddelen aan banden weest te leggen en tevens in staat is, voor de kleuters een voeding in te voeren, die afbijten en kauwen vereischt, dan kan zij bijna geheele vrijheid van dit euvel bereiken. Het resultaat zal dan niet nalaten, overal indruk te maken en tot navolging aan te sporen; evenwel zal er wegens de noodige voorlichting van de openbare meening en het vereischte wettelijke ingrijpen vermoedelijk tusschen de pionier-natie en de volgende wel een decennium verlopen, voordat bij deze de preventie bereikt is en de resultaten aan het licht treden.'...

Bron: Tijdschrift voor Tandheelkunde 1945; 52: 48-58.