

---

# Den ekologiska plaque- hypotesen

kan den förklara karies och  
parodontitsjukdomarna?

GUNNAR DAHLÉN OCH GUNNEL SVENSÄTER

De två dominerande orala sjukdomarna, karies och parodontit, är fortfarande trots en dramatiskt minskad incidens, den huvudsakliga orsaken till orala problem, ohälsa och tandförluster i alla populationer över hela världen. Sålunda lider 5-10% av den vuxna befolkningen i industrialiserande, såväl som utvecklingsländerna, av svår tandlossning och löper risken att förlora de flesta tänderna under sin livstid<sup>1-3</sup>. Betydelsen av en förhöjd medvetenhet och ökad profylax ser dock inte ut att på ett avgörande sätt ha ändrat sjukdomsbilden<sup>4</sup>. På samma sätt lider 5-10% av den vuxna befolkningen av omfattande kariesutveckling. Det är visserligen sant att kariesprevalensen, speciellt hos den unga generationen i de industrialiserade länderna, avsevärt har minskat under den sista 20-30 års perioden och uppfattas i allmänhet vara ett resultat av en intensiv exposition av fluor genom användning av tandkräm. Fortfarande finns det dock en liten grupp i varje population som frekvent utvecklar karies och för vilken mycket av de generella åtgärderna tycks ha en begränsad effekt. Även i utvecklingsländerna har 5-10% av den vuxna befolkningen en betydande kariesutveckling med en total destruktion av flera eller majoriteten av tänderna när de är unga eller i medelåldern. Dessa 5-10% av befolkningen som drabbats av karies eller parodontit tycks vara behandlingsresistenta och kallas refraktära („refractory“).

Intressant är att dessa två sjukdomar tycks uppträda på helt olika grupper av individer. Detta fenomen har rent empiriskt ofta uppmärksammats så att en individ som lider av hög kariesaktivitet sällan samtidigt visar en avancerad parodontit<sup>5</sup>. Svår parodontit å andra sidan uppvisar ofta lite karies. Detta har inte konfirmerats epidemiologiskt, vilket kan förklaras av att karies- och parodontitaktiviteten uppträder vid olika tidpunkt i livet eller på grund av svårigheter att definiera eller skilja mellan avancerad (refractory) och mindre svåra och behandlingsbara varianter av sjukdomen.

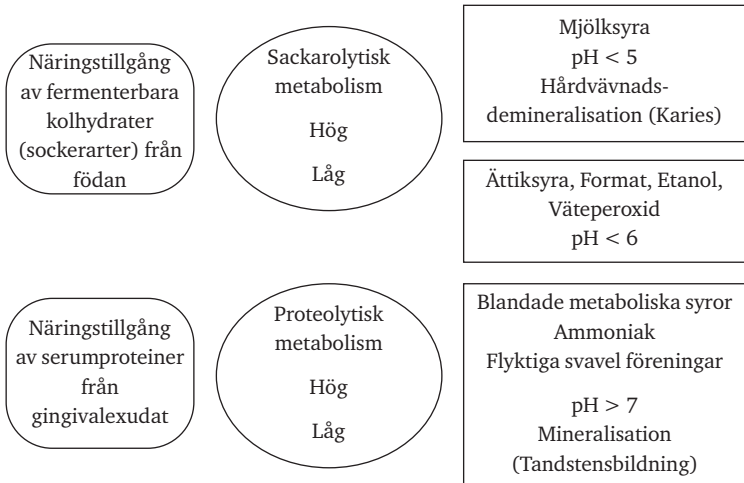
Trots ett tydligt motsatsförhållande mellan de två sjukdomarna uppvisar de några likheter. Båda orsakas av plaque-ansamlingar på tänderna. Kariesutvecklingen i bettet är påtagligt symmetriskt och den första molaren är den grupp av tänder som uppvisar det högsta DMFS-talet. Den centrala incisiven är ofta mer kariesad än den laterala och hörntanden. Första molarerna och centrala incisiverna är de första tänderna i den permanenta dentitionen som erupterar och exponeras för bakterier och saliv. Parodontit definierat som förlust av tandfäste uppvisar också en förvånansvärd symmetri, men på grund av det faktum att sjukdomen manifesteras senare i livet, är lokaliseringen till vissa tandgrupper mindre tydlig jämfört med kariesbilden. När parodontiten uppträder i yngre ålder, specifikt i form av lokaliserad juvenil parodontit (LJP), har den emellertid en karakteristisk utbredning som involverar de första molarerna och centrala incisiverna. Intressant att notera är att LJP-fall uppvisar låg kariesfrekvens.

Båda sjukdomarna har varit föremål för både den „ospecifika“ och „specifika“ plaquehypotesen<sup>6</sup>. Studierna de senaste 20-30 åren har sökt efter specifika bakterier i den etiologiska processen av sjukdomen. När dessa „tandsjukdoms-framkallande“ bakterier har testats så har specificiteten befunnits vara låg<sup>6</sup>. Relationen mellan sjukdomarna och specifika mikrobiella ekologier (den „ekologiska“ plaquehypotesen) har istället föreslagits<sup>7</sup>. Så-lunda utvecklas karies på grund av en acidogenicitet som ett resultat av en sackarolytisk fermentationsprocess, medan parodon-

tit utvecklas på grund av metaboliter som ett resultat av en proteolytisk aktivitet (Figur 1).

Syrorna som bildats är metaboliska ändprodukter i den sackarolytiska processen, och resulterar i ett pH-fall i plaquet och leder till en demineralisering av emaljen. Den tidiga fasen av emaljens demineralisering är reversibel, medan över en viss gräns sker irreversibla förändringar („kavitering“). På samma sätt inducerar metaboliterna från den proteolytiska processen en inflammationsreaktion, som på grund av ett mer flexibelt „immunförsvar“ i mjukvävnaden (jämfört med emalj), kan pågå under mycket lång tid (livslångt) som en reversibel process (gingivit). Under vissa förhållanden kan irreversibla destruktions av parodontalligamentet emellertid uppträda och registreras som fästeförlust. Sjukdomarna manifesteras (från en reversibel till en irreversibel fas) hos individerna med tiden genom modulerande faktorer. Dessa faktorer är

- Inre faktorer som är antingen genetiskt betingade eller förvärvade
- Yttre faktorer från omgivningen.



**Figur 1.** pH-beroende metaboliska aktiviteter under anaeroba förhållanden i supra- och subgingivalt plaque.

## Mikrobiologiskt specifika faktorer

Även om den mikrobiologiska specificiteten är låg innebär det inte nödvändigtvis att specifika faktorer inte är involverade. Vissa arter har egenskaper som gör dem unika och de har därmed en avgörande roll i den balans som upprättas mellan värd och mikroorganism (mikrobiell homeostas).

*Streptococcus mutans* producerar olösliga polyglukaner från en välkänd yttre faktor, nämligen sackaros. Plaque som innehåller polyglukaner, en av de viktigaste extracellulära komponenterna i plaque, underlättar också diffusionen av sockermolekyler till de inre delarna av plaquet intill tandytan, såväl som att de deltar i den adhererande processen av bakterier i biofilmen på emaljtanden<sup>8</sup>. *S. mutans* tycks finnas i alla populationer över hela världen, men det är lite känt om variationen i virulens mellan stammar av olika ursprung<sup>9</sup>. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* producerar ett leukoxin, som hämmar effekten hos neutrofila granulocyter i gingivalfickan. *A. actinomycetemcomitans* har en låg prevalens hos kaukasier, högre hos svarta och mycket högt i populationer i Sydamerika. Några nyligen publicerade rapporter visar att prevalensen av *A. actinomycetemcomitans* i den vuxna asiatiska befolkningen kan vara nära 100%. Högttoxiska varianter har isolerats från individer med afrikanskt ursprung och med samtidigt svår parodontit. Andra kandidater som föreslagits uppfylla en specifik roll i parodontit, representerar olika polymikrobiella sammansättningar.

## Karies och parodontit – ett resultat av aktiviteten hos två helt olika mikrobiella ekologier hos dentalt plaque

Den kariesrelaterade ekologin karakteriseras av den sackarolytiska processen som domineras av homofermentativa bakterier som streptokocker och laktobaciller och producerar mjölksyra,

ättiksyra och alkohol som huvudsakliga metaboliter. Detta är karakteristiskt för bakterier i svält, men som vid provocering av glukos i överskott dramatiskt ökar sin produktion av mjölksyra. Alla typer av socker som kan fermenteras av plaquebakterier bidrar till denna syraproduktion. Sackaros är unikt endast i den betydelsen att vissa bakterier kan använda den mer effektivt och därigenom producera polyglukaner som utgör en viktig komponent i dentalt plaque. Sammanfattningsvis skulle proportionen av olika syror, t ex mjölksyra/ättiksyra, fungera som ett mätvärde på den aktivitet som den sackarolytiska plaquemetabolismen har. Denna metabolism skulle hypotetiskt vara den dominerande aktiviteten i det supragingivala och kariesrelaterade plaquet.

Ekologin i tandköttsfickan påverkas endast marginellt av yttre faktorer och har därför en mycket begränsad sackarolytisk aktivitet pga frånvaro av socker i den subgingivala regionen. Eftersom gingival-exudatet principiellt är ett serum-exudat med högt innehåll av protein så dominerar den proteolytiska metabolismen<sup>10</sup>. Den subgingivala floran innehåller karakteristiskt starkt proteolytiska arter som *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* och *Bacteroides forsythus* samt mer moderat proteolytiska arter som *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* och *Peptostreptococcus micros*. Några arter som t ex *P. gingivalis* har en liten fermenterande kapacitet så att även enkla sockerarter som glukos inte kan användas. Andra arter har en enkel form av metabolism, och metaboliter från andra bakterier används. *Campylobacter* använder exempelvis succinat och format för sin energiutvinning. Metaboliterna från den proteolytiska aktiviteten är av mycket olika natur. Förutom korta karboxylsyror (t ex myrsyra, ättiksyra, smörsyra och bärnstenssyra etc) kan andra produkter som ammoniak, aminer, svavelväte och merkaptaner produceras. Flyktiga svavelföreningar kan fungera som en god markör för proteolytisk aktivitet. Nyckelfrågan i den plaquehypotesen är om dessa två ekologier kan samexistera på samma individ och under samma tid eller *de facto* är varandras motsats, så att om en typ av metabolism dominerar i plaquet kan den andra inte existera. På

så sätt skulle risken för parodontit hos en individ med hög kariesaktivitet vara låg och *vice versa*. Detta skulle förklara det speciella fenomen att karies på rotytan i allmänhet inte inträffar förrän gingivan retraheras och rotytan exponeras för det sackarolytiska supragingivala plaquet. Då dessa ekologier uppträder i olika pH-intervall förklarar det också att tandstensbildning sker i huvudsak på parodontitfall och sällan hos patienter med uttalad kariesaktivitet. Att sjukdomarna är ett resultat av mikrobiologiska processer med många olika bakteriearter inblandade, är en förklaring till att specificiteten för enskilda bakteriearter i sjukdomsprocesserna är låg.

## Bakterier är anpassningsbara

Ett annat skäl till att enskilda bakteriearter inte uppvisat den förväntade specificiteten i karies och parodontitutvecklingen beror på att man i första hand har bestämt deras kvantitativa närvaro vid sjukdomen, men inte haft möjligheten att se till deras faktiska aktivitet i sjukdomsprocessen. Denna aktivitet är synnerligen ekologiskt betingad och styrd av yttre och inre faktorer.

Sett ur bakteriernas synvinkel är skiftande miljöförhållanden en utmaning. Enbart de bakterier som har kapacitet att anpassa sig till de ekologiska betingelserna överlever. Anpassningen resulterar i att bakterierna behåller sin viabilitet men inte nödvändigtvis att de tillväxer. Välkända exempel är anpassning till låg näringstillgång, sura miljöer, värme, hög salthalt och oxidativ stress hos framför allt *Escherichia coli*. Oftast medverkar en stressreaktion i det initiala skedet av anpassningsprocessen och flertalet bakterierna tycks syntetisera stressrelaterade protein i samband med miljöförändringar<sup>11</sup>. Anpassningsmekanismerna skiljer sig mellan olika bakterier och former av stress men involverar principiellt en serie koordinerade händelser som äger rum i bakteriens membran och i cytoplasman<sup>12</sup>. Händelserna kulminerar i ett fysiologiskt tillstånd som skyddar bakterierna mot poten-

tiellt dödliga miljöförhållanden. Anpassningen innebär att bakterien uttrycker andra egenskaper. De uppvisar med andra ord en ny fenotyp som är mer tolerant mot en eller flera ekologiska parametrar. I likhet med många andra bakterier har de orala bakterierna en hög flexibilitet och anpassar sig lätt till olika miljöbetingelser<sup>13</sup>. En av de mest studerade bakterierna i detta sammanhang är *S. mutans*. Vi vet från experimentella studier att bakterien besitter förmågan att reagera på pH-förändringar i omgivningen med en stressreaktion som resulterar i att syratoleranta fenotyper utvecklas i samband med pH-chocker och näringsbrist. Ett annat exempel på anpassning hos orala bakterier är utvecklingen av fluortolerans som en följd av subletal exposition av fluor.

Utan tvekan är pH den ekologiska faktor som är av störst intresse i det kariesrelaterade placket. En sur miljö är i sig en nödvändig förutsättning för att emaljen skall demineraliseras men utövar också ett selektivt tryck på bakterier i plaquemiljön. I samband med kolhydratintag kan pH sjunka med fyra enheter inom loppet av 20 minuter. Redan 1942 noterade Stephan att det även mellan måltiderna förekommer lägre pH-värden som 5.5 i plaque hos kariesaktiva individer. Under sådana omständigheter är de enskilda bakteriernas förmåga att överleva den sura miljön avgörande för om bakterien behåller eller ökar sin plats i habitatet. Det är därför inte förvånande att syratoleranta bakterier, framför allt olika typer av orala streptokocker och laktobaciller, förekommer i stor utsträckning supragingivalt vid kariesskador. Streptokockernas syratolerans är troligen utfallet av en anpassningsprocess i plaquemiljön medan laktobacillerna redan har en inneboende nedärvd tolerans mot sura miljöer. Detta resonemang innebär att ekologin är av betydelse inte enbart för vilka olika genotyper det förekommer i dentala plaque, utan också för vilka egenskaper de olika bakteriepopulationerna uppvisar *in situ*. Med andra ord skulle förekomsten av syratoleranta fenotyper reflektera en sur miljö, vilket i sig är en nödvändig förutsättning för demineralisering av emaljen. På samma sätt ökar syraintoleranta

fenotyper i en mer neutral eller svagt alkalisk miljö som i tandköttsfickan, en miljö som också reflekterar mer proteolyiskt aktiva fenotyper. Vi har idag goda möjligheter att registrera förekomsten av olika genotyper. Däremot är möjligheterna att påvisa olika fenotyper i ett plaquematerial begränsade. Nya tekniker som konfokalmikroskopi i kombination med fluorescerande reporter-gensystem är på stark frammarsch och kommer säkerligen att öppna nya dörrar för att i framtiden kunna studera aktiviteter och egenskaper hos bakterier i såväl supra som subgingivala miljöer.

## Dentala plaque är ett av många exempel på ytassocierade mikrobiologiska samhällen

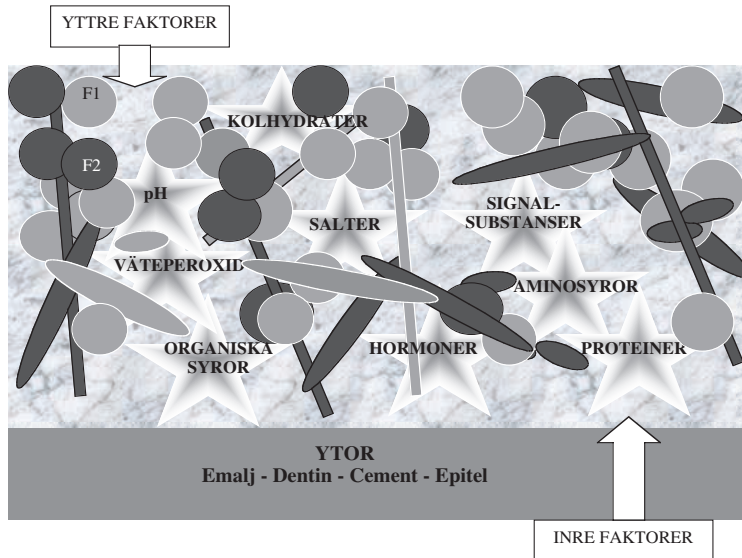
I plaque, liksom i andra naturliga ekosystem i närheten av en yta, lever bakterierna i välorganiserade samhällen. Dessa ytassocierade samhällen, som generellt brukar gå under benämningen biofilmer, karaktäriseras av en hög bakterietäthet med bakterierna inbäddade i polymera molekyler som oftast produceras av bakterierna själva. Biofilmer finns också i luftvägarna, i magtarmkanalen, i urinvägarna, på huden, på medicinska implantat, kontaktlinser och katetrar. Förutom humana biofilmer förekommer biofilmformationer i vattenslangar, inte minst i dentala units, som hyser potentiella hälsoproblem. Eftersom mer än 80% av alla infektioner orsakas av mikroorganismer som just växer på ytor, har intresset för biofilmer och bakteriernas aktivitet i dessa ökat kraftigt under de senaste åren.

Från *in vitro* försök med monokulturer av bakterier vet vi att ytassocierade mikrobiologiska samhällen bildar strukturer med mikrokolonier av bakterier i ett rikt nätverk av vattenkanaler som medger diffusion av joner och små molekyler inom biofilmen<sup>14</sup>. På grund av biofilmens arkitektur och fysiska natur är det rimligt att anta att den erbjuder bakterierna unika möjligheter till miljöanpassning. Det är numera ett välkänt fenomen att bakterier som växer på en yta uttrycker andra egenskaper än motvarande bak-



terier som växer fritt i en lösning. Litteraturen pekar alltmer på att bakterier utvecklar speciella fenotyper då de växer i en biofilm. En del av dessa fenotyper har inte påträffats tidigare eftersom bakteriernas aktivitet och egenskaper företrädesvis har studerats på laboratoriet med hjälp av fria bakterier<sup>15</sup>.

Tveklöst är det så att de ytassocierade bakterieformerna dominerar framför de fria formerna i munhålan, och för närvarande har vi mycket begränsad kunskap om egenskaperna hos de former av mikroorganismer som finns i biofilmen. Miljöbetingelser och näringsförhållandena är helt annorlunda i verkligt plaque än vid odling av bakterier på laboratoriet, och det vore därför mycket olyckligt att extrapolera kunskap om bakteriernas beteende och egenskaper från laboratorieförsök med fria bakterier till de rådande *in situ* förhållandena i dentala plaque. Med hänsyn till den tredimensionella strukturen, höga bakterietätheten och diffusionsbarriärer i dentala plaque, är det troligt att bakterierna i olika delar samtidigt utsätts för olika typer av miljöpåverkan. I både supra- och subgingivala miljöer förekommer det med största sannolikhet gradienter av till exempel näringsämnen, hormoner, organiska syror och pH. Till exempel visades helt nyligen med hjälp av fotonexcitation-mikroskopi att en mosaikliknande struktur av pH-zoner förekommer i experimentella biofilmer av orala bakterier. På grund av denna heterogenitet i ekologin bör vi utgå ifrån att det inom en population av en viss genotyp förekommer olika fenotyper i olika delar av placket (se Figur 2). Ett spännande område framöver blir att i en biofilmmiljö utforska de orala bakteriernas beteende och anpassningskapacitet. När vi väl lärt känna anpassningsmekanismerna i våra dentala biofilmer ger det oss en plattform från vilken vi kan förutsäga eller kontrollera bakteriernas beteende.



**Figur 2.** En illustration av de ekologiska förhållandena i dentala plaque i det dentogingivala området. Mikroorganismerna koloniserar de olika ytorna i området och bildar mikrokolonier inbäddade i en matrix av polymera molekyler som medger utbyte av substanser i biofilmen. I det dentogingivala området påverkas mikroorganismerna dels av yttre faktorer som till exempel kolhydrater i samband med födointag, och dels av inre faktorer genom inflödet av gingivalexsudat. Inom biofilmen utvecklas fysikaliska och kemiska gradienter vilket innebär att de enskilda bakterierna utsätts för olika typer av påverkan och genomgår fysiologiska förändringar. Därmed kan vi förvänta oss att det i biofilmen förekommer olika fenotyper inom en bakterieart. I figuren är en fenotyp markerad grå och en svart. De yttre och inre faktorerna dirigerar tillsammans med signalsubstanser från bakterierna utvecklingen av olika fenotyper inom biofilmen. Man kan förvänta sig att bakteriernas aktivitet i vissa fall domineras av yttre påverkan medan det i andra fall är tvärtom.

## Bakterier som lever på ytor är motståndskraftiga

Det är allmänt accepterat att bakterier som lever och växer i en biofilmmiljö är mer motståndskraftiga mot mekanisk, fysisk och

kemisk påverkan, inkluderande olika antimikrobiella medel, än den motsvarande fria formen av samma bakterie. Det finns studier som visar att bakterier i biofilmer är 1 000 gånger mer resistenta mot antimikrobiella medel än den fria formen av samma bakterie. Ursprungligen ansåg man att anledningen till att bakterier i en biofilmmiljö uppvisar en högre resistens var den fysiska barriär som biofilmer i sig utgör. I många sammanhang har den höga bakterietätheten och den polymera matrisen i biofilmer visat sig begränsa penetrationen av olika substanser, framför allt antibiotika<sup>16</sup>. En annan tes är att bakterierna i sig har en högre resistens på grund av att bakterier i biofilmer växer långsamt. Bakterierna förväntas leva under någon form av näringsbrist i biofilmer och resultera i ett fysiologiskt tillstånd liknande svält, som i kombination med den låga tillväxthastigheten kan ge bakterierna en högre resistens. Nyligen har en annan hypotes framförts. Denna går ut på att den låga tillväxthastigheten hos biofilmbakterier inte beror på begränsad näringstillförsel utan på att biofilmmiljön initierar en generell stressreaktion som resulterar i fysiologiska förändringar som ger skydd mot skadliga effekter av många olika agens. Hypotesen är attraktiv därför att den förklarar varför biofilmfenotyper många gånger har högre virulens och är mer resistenta inte bara mot antimikrobiella medel utan också mot fluktuerande pH, salthalter och temperaturer.

Bakterier som lever i dentalt plaque har generellt en låg tillväxthastighet, och generationstider *in situ* på mer än 66 timmar har rapporterats. Framtiden får utvisa hur sambanden ser ut mellan de orala bakteriernas överlevnad, virulens och resistens samt hur svälttillstånd och diverse stressresponser medverkar till att utveckla speciella biofilmfenotyper.

## Bakterier kommunicerar med varandra

De fysiologiska förändringar som bakterierna genomgår i biofilmer liknar i viss mån det beteende och organisation som före-

kommer i vävnader hos högre organismer. Mycket tyder på att bakterier som växer nära varandra i en biofilm kommunicerar med varandra. Olika bakteriearters förmåga att kollektivt bete sig som en grupp skulle kunna innebära uppenbara fördelar vid bakteriekolonisation av en ny värd, försvar och utmanande miljöbetingelser<sup>17</sup>. Vid en hög bakterietäthet exporterar bakterierna lågmolekylära substanser som signalerar till närliggande bakterier. De hittills bäst karakteriserade signalsubstanserna hos grampositiva bakterier är små peptider, medan de hos gramnegativa bakterier är homoserinlaktoner. Bakterierna reglerar diverse fysiologiska processer via dessa intercellulära signaleringssystem. Signaleringsprocessen, som generellt går under benämningen *quorum sensing*, har visat sig ha betydelse såväl för initiering av olika stressreaktioner och reglering av tillväxthastighet som för utveckling av antibiotikaresistens och virulens<sup>18</sup>. Då bakterier växer nära varandra i en biofilm är det troligt att quorum sensing medverkar till att reglera de cellulära funktionerna vid övergången till en biofilm-fenotyp.

Helt nyligen identifierades en signalpeptid bestående av 21 aminosyror hos *S. mutans* som växte i biofilmer *in vitro*. Signalpeptiden visade sig vara nödvändig för att bakterien skulle kunna utveckla sin genetiska kompetens, dvs för bakteriens förmåga att uppta DNA. Detta är det första exemplet på ett bakteriellt signaleringssystem hos grampositiva biofilmbakterier. Nya rön visar också att signaleringssystemet medverkar till att *S. mutans* ökar sin syratolerans. Det är frestande att tänka sig att en bakterie, som först registrerar en pH-förändring och omsätter informationen, kan med hjälp av sitt signalsystem meddela sina grannar i ett dentalt plaque att utveckla sin syratolerans. Genom att kombinera interbakteriell kommunikation med fysiologisk anpassning skulle stora delar av en population snabbt kunna utveckla ett skydd mot ett agens som annars skulle leda till dess död. Sammanfattningsvis kan sägas att det verkliga dentala placket erbjuder bakterierna unika möjligheter att till fullo utveckla sin anpassningsförmåga. Den naturliga miljön stimulerar troligen en

optimal induktion av syratolerans och andra virulensfaktorer, och detta i en omfattning som är betydligt högre än under traditionella odlingsförhållanden på laboratoriet.

## Sammanfattning

Den ekologiska plaquehypotesen betonar betydelsen av det dentala plaquet som en biofilm – ett mikrobiellt samhälle som utvecklas generellt på ytor som tandytan, vilket ger en lång rad fördelar för mikroorganismerna, och som grundar sig på samverkan mellan mikroorganismer och mellan mikroorganismer och värden. I denna speciella ekologiska miljö minskar enskilda arters betydelse till förmån för kollektivet samt att de uttrycker andra egenskaper än vad vi ser när de förekommer fritt utanför biofilmen. Bland annat så är metabolismen i allmänhet väsentligt lägre men kan aktiveras av vissa yttre och inre faktorer. Den ekologiska plaquehypotesen bygger på att karies och parodontit utvecklas som resultatet av ökad aktivitet i mikrobiologiska processer (sackarolytisk och proteolytisk). De två dominerande mikrobiologiska processerna härstammar från två helt olika ekologier vilka i princip inte förekommer samtidigt, och förklarar att karies och parodontit sällan uppträder samtidigt på samma individ. Strategin för förebyggande och behandling av karies och parodontit skulle därmed vara att reducera aktiviteten i dessa processer snarare än att reducera/eliminera enskilda bakteriearter.

## LITTERATUR

- 1 Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man, rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;13:431-40.
- 2 Luan W-M, Baelum V, Chen X, Fejerskov O. Tooth mortality and prosthetic treatment patterns in urban and rural Chinese aged 20-80 years. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1989;17:221-6.

- 3 Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Tooth mortality in an adult rural population in Kenya. *J Dent Res* 1988;67:496-500.
- 4 Hugoson A, Koch G, Slotte C, Bergendal T, Torstensson B, Torstensson H. Caries in individuals aged 3-80 years in Jönköping, Sweden in 1973, 1983, 1993. *Commun Dent Oral Epidemiol* 2000;28:90-6.
- 5 Ainamo S, Ankkuriniemi O, Parvianen K. The prevalence of caries and periodontal disease in the same subjects. In: Lehner T, Cimasoni G, eds. *The bacteria between caries and periodontal disease II*. London: Academic Press, 1980:9-29.
- 6 Bowden GH. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Comm Dent Oral Epidemiol* 1997;25:76-81.
- 7 Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263-71.
- 8 Carlsson J, Hamilton I. Metabolic activity of oral bacteria. In: Fejerskov O, Thylstrup A, eds. *Textbook of Clinical Cariology*. Copenhagen: Munksgaard, 1994:71-88.
- 9 Burne RA. Oral streptococci... products of their environment. *J Dent Res* 1998;77:445-52.
- 10 Wei GX, van der Hoeven JS, Smalley JW, Mikx FHM, Fan MW. Proteolysis and utilization of albumin by enrichment cultures of subgingival microflora. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:348-51.
- 11 Storz G, Hengge-Aronis R, eds. *Bacterial stress responses*. Washington DC: ASM Press, 2000.
- 12 Van Bogelen RA, Greis KD, Blumentahl RM, Tani TH, Matthews TG. Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends Microbiol* 1999;7:320-8.
- 13 Bowden GHW, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:54-85.
- 14 Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
- 15 Brown MRW, Barker J. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol* 1999;7:46-50.

- 16 Wimpenny JWT, Kinniment SL, Scourfield MA. The physiology and biochemistry of biofilms. Society for Applied Bacteriology Technical Series 1995;30:51-94.
- 17 de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 2000;68:4839-49.
- 18 Dunny GM, Winans SC. Cell-cell signaling in bacteria. Washington DC: ASM Press, 1999.

---

---