

Cjepivo protiv karijesa?

Daniela Medojević¹, Matej Par², prof.dr.sc. Josip Lukač³

[1] Studentica 3. godine

[2] Student 4. godine

[3] Katedra za imunologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

UVOD

Karijes se ubraja u najčešće infektivne bolesti današnjice, pogađa sve dobne skupine, ne bira između siromašnih i bogatih. WHO potvrđuje da je dentalni karijes ozbiljan zdravstveni problem čak i u većini industrijaliziranih zemalja, te pogađa 60-90% školske djece i skoro sve odrasle. Tako u SAD-u koji u prevenciji karijesa pokazuje impresivne rezultate, čak 46% djece u dobi od 5-17 godina ima karijes.

Prof. Loesch definira karijes kao: "Zubni karijes je kronična, kompleksna bakterijska infekcija koja rezultira miligramskim gubicima minerala iz zuba koji je zahvaćen infekcijom. Usprikoš višestruke prirode ove infekcije, najvažniji čimbenici su bakterije i prehrambene navike koje osiguravaju da se bolest razvije i kao takva prepoznata."

Karijesu prethodi dentobakterijski plak, koji je mekana naslaga živih i neživih mikroorganizama u matriksu, bogatom polisaharidima i glikoproteinima, koji čvrsto prijanja uz zubnu površinu. Ta želatinozna masa sa zuba se može skinuti samo mehaničkim čišćenjem, a ponovno nastaje već nakon 20-ak minuta. U ljudskom dentobakterijskom plaku nalazimo 200-300 različitih vrsta bakterija koje imaju važnu ulogu u nastajanju karijesa no najvažniju ulogu ima *Streptococcus mutans*. Ostale bakterije plaka su *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*. Sve su to acidogeni oralni mikroorganizmi koji fermentacijom ugljikohidrata stvaraju kiseline koje će 'nagristi' zubnu površinu, odnosno uzrokovati demineralizaciju.

Streptococcus mutans se smatra najkariogenijim patogenom. Visoko je acidogen te stvara kratkolančane karboksilne kiseline koje rastvaraju tvrda zubna

tkiva – caklinu i dentin. Usto stvaraju netopljive izvanstanične polisaharide koji povećavaju njihovu adheziju, ali i adheziju drugih bakterija na zubnu površinu. Od mutans streptokoka najčešće su sa zubnih površina izolirani *S. mutans* i *S. sobrinus*. *S. mutans* je kariogeniji jer na površini stanice posjeduje posebne proteine koji mu omogućavaju bolje prijanjanje. Kolonizacija usne šupljine streptokokima počinje ubrzo nakon erupcije zuba, a pošto je mutans fakultativni anaerob može preživjeti bilo gdje u usnoj šupljini.

Proces nastajanja karijesa posredovanog mutans streptokokima možemo podijeliti na 3 faze:

Prva faza obuhvaća inicijalnu adheziju mikroorganizama na zubnu pelikulu, odnosno tanku prozirnu glikoproteinsku naslagu bez stanica i bakterija. Pac protein ili antigen I/II posreduje u adheziji, kako mutans streptokoka, tako i drugih bakterija. On je važan za inicijalnu adheziju streptokoka na još neinficiranu pelikulu.

Druga faza, poznata kao akumulacija, ovisi o prisutnosti saharoze (koja iz hrane lako prodiere u plak zbog svoje male molekulske težine i dobre topljivosti), glukoziltransferaze (GTF) i proteina koji streptokoku omogućuju vezanje na izvanstanične polisaharide (glucan-binding proteins - GBPs). Nakon razgradnje saharoze na glukozu i fruktozu glukoziltransferaza sintetizira izvanstanične polisaharide dekstran, levan i mutan. Mutans streptokoki sadrže proteine koji vežu glukozu, te su oni zapravo proteinski receptori koji vežu polisaharide. Glukoziltransferaza također ima receptornu domenu, pa i ona sudjeluje u vezanju na polisaharide plaka. U prisutnosti izvanstanične glukoze i saharoze mutans streptokoki proi-

zvede unutarstanične polisaharide slične glikogenu (intracellular glycogen-like-polysaccharides – IPS). Sinteza IPS-a je proporcionalna koncentraciji izvanstaničnih ugljikohidrata. Metabolizam IPS-a može ubrzati razvoj karijesa te stoga pridonosi kariogenosti mutans streptokoka.

U trećoj fazi se izrazito pojačava tvorba izvanstaničnih polisaharida koji pridonose voluminoznosti plaka i smanjuju njegovu propusnost. Time onemogućuju izlazak kiselih metabolita iz plaka te ulaz pufera i kisika. Zbog manjka kisika nastaju anaerobni uvjeti, a zbog manjka pufera snižava se pH te dolazi do nagomilavanja kiselina koje ne mogu izaći iz plaka i nagriza tvrdi zubni tkiva. Te velike količine kiselina dovest će do demineralizacije cakline i do stvaranja inicijalne lezije, koja će se s vremenom proširiti u dubinu. Karijes je, dakle, u svojoj osnovi bolest demineralizacije tvrdih zubnih tkiva.

CJEPIVO

Ideja o razvoju cjepiva protiv karijesa pojavila se čim je otkrivena mikroba etiopatogeneza karijesne lezije (1). Koncept ima smisla, jer ako karijes shvatimo kao infektivnu bolest uzrokovanu specifičnim mikroorganizmima, tada bi (teoretski) trebalo biti moguće izazvati imunizaciju na te mikroorganizme i spriječiti njihovo štetno djelovanje, odnosno prevenirati bolest. Iako se smatra da je za razvoj karijesa najzaslužniji *S. mutans* (2), postoji čitav niz drugih mikroorganizama koji ulaze u sastav biofilma (plaka) i lučenjem kiselina uzrokuju demineralizaciju. Dakle, biofilm je složena zajednica mnogo različitih vrsta (3) s različitim acidogenim a time i kariogenim potencijalom. Unatoč tome, pretpostavlja se da je eliminacijom streptokoka s površine zuba moguće spriječiti razvoj karijesa, i to iz dva razloga.

Prvo, streptokoki su najznačajniji proizvođači kiselina u plaku i oni svojim acidogenim potencijalom uvelike premašuju ostale bakterije iz plaka. Drugo, streptokoki sintezom izvanstaničnih polisaharida omogućuju drugim mikroorganizmima vezanje na biofilm, oni osiguravaju „plodno tlo“ za daljnju kolonizaciju.

Ovaj prilično intrigantan koncept liječenja jedne od najčešćih bolesti čovječanstva ubrzo je podvrgnut laboratorijskim ispitivanjima. Godine 1969. Bowen je prvi pokazao princip djelovanja cjepiva (4): majmuni koji su bili intravenski imunizirani vrstom *S. mutans* razvili su manje karijesa. Iako u istraživanju nisu mjereni imunološki parametri (npr. razina IgG i IgA), ovaj jednostavni eksperiment je jasno pokazao da je prevencija karijesa aktivnom imunizacijom moguća i ostvariva. Potom su provedena mnoga pretklinička ispitivanja, najvećim djelom na glodavcima i primatima koja su potvrdila potencijalnu korist od aktivne imunizacije u sprečavanju zubnog karijesa. Isprobana je i pasivna imunizacija koja je također dala ohrabrujuće rezultate. Iako je djelotvornost imunizacije prilično opsežno istraživana na životinjskim modelima, danas nam nedostaju ispitivanja na ljudima koja bi potvrdila učinkovitost i opravdala kliničku primjenu cjepiva.

CILJNI ANTIGENI I MEHANIZAM DJELOVANJA

Za proizvodnju cjepiva potrebno je odabrati antigene na koje želimo izazvati imunosni odgovor. Pritom možemo koristiti cijelu umrtvljenu bakterijsku stanicu, određeni antigen ili antigene, odnosno pojedine antigenske epitope (5). Imunizacija cijelim stanicama streptokoka kao i većim dijelovima stanica nije poželjna, jer zbog sličnosti antigena s tkivima srca nastaju HRA (heart reacting antibodies) koja križno reagiraju s tkivima endokarda i miokarda što dovodi do trajnih oštećenja ovih tkiva (slično kao kod reumatske groznice) (6). Razumljivo je da cjepivo s tako ozbiljnim nuspojavama nije klinički primjenjivo.

Stoga se razvoj (potencijalnog) cjepiva temelji na nekoliko ciljnih antigena, odnosno njihovih epitopa. Svi ti antigeni su značajni faktori patogenosti i imaju važnu

ulogu u patogenezi karijesa. Izazivanjem imunosti na jedan ili više njihov organizam će stvarati antitijela koja će ih blokirati ili pak putem nekog drugog izvršnog mehanizma (fagocitoza, citotoksičnost posredovana antitijelima [antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC], aktivacija komplementa) eliminirati streptokoke te spriječiti njihovo štetno djelovanje. Ciljni antigeni koji se koriste u većini istraživanja su adhezini, GTF i GBP.

Mehanizam djelovanja. Blokiranjem adhezina (tzv. antigen I/II) onemogućit će se inicijalno vezanje streptokoka na pelikulu. To će usporiti daljnju akumulaciju plaka, budući da je streptokok neophodan za vezanje drugih mikroorganizama. Vezanje antitijela na GTF može imati dva učinka: ometanje njegove sintetske funkcije inhibirat će proizvodnju izvanstaničnih polisaharida, a blokada dijela odgovornog za adheziju ometati će vezanje na biofilm. Sličan učinak imat će i vezanje antitijela na GBP – nemogućnost vezanja na polisaharide plaka i usporena/onemogućena akumulacija streptokoka. Nadalje, vezanje antitijela na površinu bakterijske stanice može uzrokovati povezivanje streptokoka u veće agregate koji se slabije vežu na pelikulu nego pojedinačne bakterije (7). Antitijela također mogu djelovati opsonizacijski i omogućiti fagocitozu posredovanu neutrofilima iz sulkusne tekućine. Aktivacijom komplementa ili poticanjem ADCC-a mogu dovesti do lize bakterijske stanice.

Uočeno je da je imunosni odgovor jači ako se za imunizaciju umjesto cijelih antigena primjene njihove podjedinice, odnosno pojedini epitopi koji su važni za inicijalnu adheziju, katalitičke procese (proizvodnja polisaharida) ili pak vezanje na već izlučene polisaharide (8). Tako pripremljena vakcina sastojala bi se od jednog ili kombinacije različitih epitopa koji su dijelovi molekula važnih za patogenost streptokoka – adhezina, GTF i GBP. Dakle, rekombinantnim tehnikama proizveli bi se „hibridni“, kimerni proteini koji bi izazvali imunosnu reakciju na molekule čija je funkcija odgovorna za nastanak i razvoj bolesti. Ovim pristupom ostvario bi se imunosni odgovor koji bi istovremeno obuhvatio više čimbenika zaslužnih za patogenezu karijesa. Uz to bi se postigla

i veća specifičnost imunoreakcije, što je važno za opstanak komenzalne, nepatogene flore. Naime, imunizacijom na cijelu molekulu Ag I/II stradali bi i mnogi nekariogeni streptokoki jer na svojoj membrani imaju sličan protein. Izborom epitopa specifičnih samo za *S. mutans* izbjegava se ova križna reaktivnost, što je poželjno jer komenzalna („fiziološka“) flora antagonizira *S. mutans* i na neki način djeluje karijes-protektivno.

Da bi se pojačala imunogeničnost umjetno stvorenog proteina, u njega se može ugraditi i prikladan adjuvans, npr. B podjedinica kolera-toksina (nije toksična, a omogućava vezanje na crijevni epitel). Imunogeničnost se također može poboljšati konjugacijom sintetskog proteina s različitim bakterijskim polisaharidima (kapsularni polisaharid *H. Influenzae* ili toksoid tetanusa). Ovo je posebno važno za poticanje memorije mukoznog imunskog sustava (vidi dalje).

SISTEMSKA ILI MUKOZNA IMUNIZACIJA?

Glavna antitijela zastupljena u slini su IgG i sekrecijski IgA (sIgA). IgG u usnu šupljinu dolazi iz plazme, kroz kapilarni pleksus ispod spojnog epitela kao sastojak sulkusne tekućine. sIgA je glavno antitijelo tzv. mukozne imunosti i najzastupljeniji je razred imunoglobulina u slini. U ustima ga proizvode plazma stanice smještene u velikim i malim slinovnicama, nakon podraživanja antigenom. Miješanjem sulkusne tekućine i sline iz slinovnica nastaje tzv. kompletna slina koja sadrži antitijela obaju razreda.

Dok je IgG glavna komponenta „sistemске“ imunosti, sIgA je karakterističan za mukoznu imunost. Tzv. mukozni imunosni sustav (MALT – mucosal-associated lymphoid tissue) dio je imunskog sustava koji je smješten uz oralnu, gastrointestinalnu, respiratornu, vaginalnu i konjunktivnu sluznicu, dakle na mjestima gdje je organizam pojačano izložen prodoru stranih tvari. Njegovu iznimnu važnost za obrambenu sposobnost najbolje pokazuje podatak da u MALT-u ima više plazma-stanica nego u svim ostalim limfnim tkivima – limfnim čvorovima, slezeni i koštanoj srži (9). Na podražaj antigenom, MALT reagira pro-

izvodnjom sIgA i njegovim lučenjem u sklopu mukoznog sekreta. Iako su stanice MALT-a raspoređene tako da anatomske pripadaju određenim organskim sustavima (npr. Peyerove ploče u crijevu), imunostni odgovor ostvaruje se na razini cijelog organizma. To znači da će antigen kojem su bili izloženi imunociti na određenom mjestu (npr. u crijevu) inducirati stvaranje sIgA i na udaljenim mjestima: u slini, suzama, sekretu rodnice itd. Ovakvo funkcioniranje MALT-a omogućava nam da primjenom cjepiva na različitim sluznicama (oralnoj, nosnoj, crijevnoj, pa čak i rektalnoj) izazovemo željeni imunostni odgovor i proizvodnju sIgA koji će se lučiti u slini. Prije se smatralo se da mukozna imunost nema mogućnost memorije (10, 11), što bi predstavljalo veliku prepreku primjeni cjepiva tim putem – imunizacija je beskorisna ako učinak prekratko traje. Ipak, neka novija istraživanja pokazuju da se memorija može potaknuti uporabom različitih adjuvansa, kao što su enterotoksini (npr. kolera) ili pak bakterijski polisaharidi.

Dakle, dva su moguća načina primjene cjepiva: parenteralno (subkutano ili intramuskularno) i „mukozno“, tj. na sluznice. Istraživanja na životinjama su pokazala da oba načina izazivaju mjerljivi imunostni odgovor koji se očituje porastom razine IgG u plazmi, sIgA u slini i ostalim sluzničnim sekretima te smanjenom incidencijom karijesa. Pritom parenteralna primjena inducira proizvodnju samo IgG-a, dok kod mukozne aplikacije nastaju i sIgA i IgG (12). Smatra se da je mukozna imunizacija učinkovitija, ne samo zbog toga što istovremeno potiče sistemski i mukozni odgovor, već i zbog toga što se primjenom cjepiva na sluznice izbjegavaju potencijalne nuspojave parenteralne imunizacije.

NAČINI PRIMJENE

Zbog svega navedenog, danas se prednost daje mukoznim putovima imunizacije. Cjepivo može biti primijenjeno peroralno, intranazalno, tonzilarno, na male žlijezde slinovnice ili rektalno (8).

Peroralnim putem cjepivo dopijeva do crijevnog limfnog tkiva (GALT – gut-associated lymphoid tissues) i tamo potiče mukozni imunostni odgovor. Kao što je prije navedeno, odgovor se očituje u

svim dijelovima MALT-a, pa tako i u slini. Izlučeni sIgA djeluje na streptokoke i smanjuje incidenciju karijesa što je dokazano u životinjskim modelima. Odgovor se može pojačati konjugacijom antigena (ili njihovih dijelova) s enterotoksinima kolere ili E. coli, te „pakiranjem“ antigena u mikrokapsule ili liposome što M-stanicama olakšava fagocitozu i poboljšava predočavanje antigena. Ovom načinu primjene se prije svega zamjera to što cjepivo mora proći relativno dugi put do mjesta djelovanja, pri čemu podliježe proteolitičkoj degradaciji u želucu. Svedeno, pokusi su pokazali njegovu učinkovitost i potencijal za kliničku primjenu.

Intranazalnom aplikacijom imunost se stimulira u dijelu MALT-a koji je anatomske puno bliže oralnoj sluznici. Limfno tkivo nosne sluznice (NALT – nasal lymphoid tissue) je uz GALT najzaslužnije za pokretanje mukozne imunosti (13). Za intranazalnu primjenu potrebna je manja količina antigena jer on ne podliježe proteolitičkoj degradaciji kao kod peroralne primjene. Imunostni odgovor i postignuti učinak je sličan kao i kod peroralne primjene – inducira se i mukozna (sIgA) i sustavna imunost (IgG). Intranazalna primjena je prilično jednostavna i praktična, posebice kod male djece koja su najprikladnija dobna skupina za vakcinaciju (vidi dalje). Intranazalna aplikacija se danas smatra najboljim izborom za eventualnu kliničku primjenu.

Tonzilarnom primjenom antigen dolazi u kontakt s velikom nakupinom oralnog limfnog tkiva. Iako se ovakvom imunizacijom ostvaruje jači sustavni (putem IgG) nego mukozni odgovor (putem sIgA), i ovaj put imunizacije pokazao se djelotvornim u ispitivanjima na životinjama.

Primjena na male žlijezde slinovnice u sluznici obraza, usnica i nepca također se pokazala uspješnom. Male slinovnice imaju kratke i široke izvodne kanale oko kojih se nalazi limfno tkivo pa su prikladno mjesto aplikacije antigena u svrhu izazivanja mukoznog odgovora.

Na kraju, cjepivo se može primijeniti i rektalno. To „najudaljenije“ mjesto primjene ima određene prednosti jer antigen direktno dolazi u kontakt s GALT-om, a da pritom ne mora proći kroz cijeli probavni sustav. Rektalna primjena bi mogla

biti korisna kod djece s respiratornim bolestima kod koje je intranazalna primjena kontraindicirana.

PASIVNA IMUNIZACIJA

Sve dosad navedeno odnosi se na aktivnu imunizaciju. Istraživanja su pokazala da se i pasivnom imunizacijom može postići određeni stupanj zaštite od infekcije, odnosno kolonizacije streptokoka, a time i od razvoja karijesa. Pasivna imunizacija podrazumijeva primjenu gotovih antitijela (na prije opisane ciljne antigene) topikalno na sluznicu usne šupljine. Razumljivo je da pasivna imunizacija ne potiče razvoj memorije, budući da nema aktivnog imunostnog odgovora, što je veliki nedostatak. Topikalno primijenjena antitijela ostaju na površini sluznice i zubi tek nekoliko sati, a u najboljem slučaju do 3 dana, ako se adsorbiraju na plak. Tako kratkotrajno djelovanje očito ne bi bilo previše učinkovito, jer bi se primjena morala ponavljati u kratkim vremenskim razmacima. Ipak, u jednom zanimljivom istraživanju (14) pokazalo se da je i pasivnom imunizacijom moguće ostvariti relativno dugoročne rezultate. Ispitanici su prvo tijekom 9 dana provodili oralnu higijenu klorheksidinom čime su eliminirali S. mutans, a nakon toga tijekom 3 tjedna lokalno primjenjivali mišji IgG protiv antigena I/II. Iznenađujuće, ponovna kolonizacija te bakterije je uslijedila tek nakon 1-2 godine, iako je jasno da antitijela nisu mogla tako dugo ostati na površini zuba. Vjerojatno je nakon eliminacije streptokoka i onemogućavanja njegovog ponovnog naseljavanja tijekom 3 tjedna primjene antitijela nastupila rekolonizacija drugih nekariogenih bakterija. One su streptokoku zauzele „životni prostor“ i kroz duži period spriječile njegovo ponovno pojavljivanje.

U ispitivanjima su prokušana antitijela različitog porijekla, ali njihova učinkovitost je bila znatno kraćeg trajanja. Korištena su antitijela iz kravljeg mlijeka, žumanca jajeta, već spomenuta mišja antitijela, pa i antitijela proizvedena od transgeničnih biljaka. Posljednja su posebno zanimljiva jer se novim tehnikama genetičkog inženjerstva mogu stvoriti biljke koje će proizvoditi velike količine antitijela na željeni antigen ili kombinaciju antigena (tzv. plantibodies) (15). Zbog

relativno jeftine (i potencijalno masovne) proizvodnje takva antitijela bi se mogla u budućnosti naći u sastavu zubnih pasta ili tekućina za ispiranje usta. Budući da se ovi proizvodi primjenjuju svakodnevno, pasivna imunizacija bi unatoč svojem kratkotrajnom djelovanju mogla pružiti adekvatnu zaštitu.

KADA JE NAJPOGODNIJE VRIJEME ZA CIJEPLJENJE?

Eksperimenti su pokazali da se imunوسي odgovor na *S. mutans* može potaknuti primjenom cjepiva u bilo kojoj životnoj dobi. Djelotvornost i trajanje učinka će, dakako, ovisiti o mnogo faktora: o upotrijebljenom antigenu (ili dijelu ili kombinaciji antigena), o načinu primjene kao i o individualnom odgovoru organizma. Postavlja se pitanje: u kojoj životnoj dobi treba primijeniti cjepivo da bi se ostvarila optimalna zaštita, odnosno spriječila pojava karijesa?

Malobrojna ispitivanja na odraslim dobrovoljcima su pokazala da se više ili manje zadovoljavajući stupanj zaštite može postići ako se cjepivo primijeni nakon intenzivne oralne profilakse (kojom se ukloni *S. mutans*). Tada nastali imunوسي odgovor na određeno vrijeme (do nekoliko godina) sprečava njegovu rekolonizaciju. Ipak, smatra se da su najbolji kandidati za cijepljenje djeca u dobi od oko 12 mjeseci (16), jer u toj dobi u njihovoj usnoj šupljini još nije prisutan *S. mutans*. Naime, kolonizacija nastupa s pojavom „prozora infektivnosti“ (17), odnosno između 18. i 36. mjeseca života. Cijepljenje u 12. mjesecu života omogućilo bi organizmu da razvije imunost prije vremena „prozora“ čime bi se spriječila ta inicijalna kolonizacija. Prema tome, cijepljenje u 12. mjesecu trebalo bi potaknuti razvoj imunosg odgovora koji će do „prozora“ biti u potpunosti spreman i kompetentan suprotstaviti se nadolazećoj infekciji vrstom *S. mutans* te spriječiti njeno naseljavanje na površini zuba. Zaštita postignuta ovim pristupom bila bi učinkovitija i dugotrajnija nego pri primjeni cjepiva odraslima, u kojih je kolonizacija već nastupila.

ZAKLJUČAK

Istraživanja na životinjama su pokazala da je izrada cjepiva protiv karijesa

mooguća. Izazivanje imunosg odgovora na antigene bakterije *S. mutans* rezultiralo je otežanom kolonizacijom ili rekolonizacijom, smanjenjem broja tih bakterija te (što je klinički najvažnije) smanjenom incidencijom karijesa. Postoje različiti pristupi – aktivna ili pasivna imunizacija, različiti putovi primjene cjepiva i različiti ciljni antigeni, a buduća će se istraživanja usmjeriti k pronalaženju onog najučinkovitijeg. Trenutno veliki problem predstavlja manjak istraživanja na ljudima – malobrojna istraživanja provedena na dobrovoljcima nisu uspjela potvrditi isplativost u kliničkoj primjeni. Uz to, za postizanje najveće učinkovitosti potencijalnog cjepiva, trebalo bi ga u istraživanjima davati maloj djeci, što je i veliki etički problem. Nadalje, postavlja se pitanje je li uopće opravdano razvijati (i jednom u budućnosti eventualno primjenjivati) cjepivo protiv tako „benigne“ bolesti kao što je zubni karijes. Naime, svaka vakcinacija nosi rizik od nuspojava, pa neki autori smatraju da bi cijepljenje trebalo ostati rezervirano samo za ozbiljne bolesti koje ugrožavaju život (16).

S druge strane, već i djelomično djelotvorno cjepivo bi moglo reducirati incidenciju karijesa, a time i značajno smanjiti troškove zdravstvene zaštite. Izgleda da će trebati odvuđnuti između potencijalnih dobrobiti i opasnosti od eventualno primjenjivog cjepiva prije nego što se ono počne primjenjivati na ljudima. Svakako će trebati još mnogo kliničkih ispitivanja da se dokaže djelotvornost cjepiva protiv karijesa i opravda njihova primjena. ☺

LITERATURA

1. **Clarke JK.** On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924; 5: 141-7.
2. **Loesche WJ.** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.
3. **Wolf HF, Rateitschak-Plüss EM, Rateitschak K.** Parodontologija - stomatološki atlas. 1st ed. Zagreb: Naklada slap; 2009.

4. **Bowen WH.** A vaccine against dental caries. A pilot experiment in monkeys (*Macaca irus*). *Br Dent J.* 1969;126: 159-66.
5. **Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, et al.** *Imunologija.* 6th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
6. **Ferretti JJ, Shea C, Humphrey MW.** Cross-reactivity of *Streptococcus mutans* antigens and human heart tissue. *Infect Immun.* 1980;30(1):69-73.
7. **Liljemark WF, Bloomquist CG, Germaine GR.** Effect of bacterial aggregation on the adherence of oral streptococci to hydroxyapatite. *Infect Immun.* 1981;31(3):935-41.
8. **Smith DJ.** Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13:335-49.
9. **Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J.** *Immunology.* 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2003.
10. **Lukač J.** *Klinička imunologija - skripta.* Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2004.
11. **Basić V, Jurić H.** Cjepivo za zubni karijes - realnost ili mit? *Medix.* 2007;72/73:181-2.
12. **Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubman MA.** A caries vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. *Caries Res.* 2004;38:230-5.
13. **Ogra PL, Faden H, Welliver RC.** Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):430-45.
14. **Ma JK, Hunjan M, Smith R, Kelly C, Lehner T.** An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1990; 58:3407-14.
15. **Wycoff KL.** Secretory IgA antibodies from plants. *Curr Pharm Des.* 2005;11(19):2429-37.
16. **Taubman MA, Nash DA.** The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. *Nat Revs Immunol.* 2006;6:555-63.
17. **Caulfield 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.