

ارزیابی اثر ضد میکروبی کلر هگزیدین و اوژنول بر روی سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم استرپتوکوکوسهای ویریدانس جدا شده از پلاکهای دندانی

حمیده مبارک زاده^۱، جواد حامدی^{۲،۳*}، ستاره حقیقت^۴

^۱ کارشناس ارشد، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ استاد، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۳ استاد، کلکسیون میکروارگانیسمهای دانشگاه تهران، مرکز پژوهشی فناوریها و فرآورده های میکروبی دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۴ استادیار، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۵/۱۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۲۸

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Eugenol on Planktonic and Biofilm-producing Viridans Group Streptococci Isolated from Dental Plaques

Hamideh Mobarakzadeh¹ - Javad Hamed^{2,3*} - Setareh Haghight⁴

¹ Master of Science, Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran

³ Professor, Microorganisms Collection, Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: February 2017; Accepted: 17 February 2018

Introduction: Viridans streptococci are among the factors involved in dental caries and the subsequent diseases due to their ability in biofilm formation and the synthesis of extracellular polymers. Considering the difference in the resistance of biofilm forms and plankton pathogenic bacteria to bactericide agents, we aimed to compare the effect of chlorhexidine mouthwash and eugenol on planktonic and biofilm forms of viridans streptococci to find the effective concentrations of the two products.

Materials and Methods: Viridans streptococci were isolated from 20 human dental plaque samples using biochemical tests. The strain with the highest biofilm formation activity was identified more precisely using 16SrRNA gene analysis. The effects of chlorhexidine (0.06-0.2 w/v%) and eugenol (29.7-99 w/v%) were assessed on the planktonic and biofilm cells of the isolated viridans streptococci using macrodilution broth and polystyrene microplates, respectively. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) of these antiseptics on the isolated viridans streptococci was determined.

Results: Strain UTMC 2446 with 98.04% similarity to *Streptococcus sanguinis* had the highest biofilm production ability. The 0.2% and 99% concentrations of chlorhexidine and eugenol inhibited biofilm formation, respectively, while these compounds could effectively inhibit planktonic cell growth at the 0.14% and 79.2% concentrations, respectively.

Conclusion: For the tested compounds, the effective concentrations needed to inhibit biofilm formation were higher than those required for planktonic growth arrest. Moreover, due the possibility of emergence of resistant strains, as well as the fact that the required concentration is equal to the maximum concentration of the compounds in commercial products, their antimicrobial potential must be regularly monitored. Our findings can be beneficial for manufacturing and quality control facilities.

Keywords: Viridans streptococci, *Streptococcus sanguinis*, Biofilm, Chlorhexidine, Eugenol.

*Corresponding Author: jhamed@ut.ac.ir

J Mash Dent Sch 2018; 42(1): 75-86.

چکیده

مقدمه: استرپتوکوکهای دهانی با سنتز پلیمرهای خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح دندانی از عوامل پوسیدگی دندان و بیماریهای متعاقب آن هستند. نظر به تفاوت مقاومت اشکال بیوفیلم و پلانکتونی باکتریهای بیماری زا در برابر عوامل باکتریوسید، مطالعه کنونی با هدف بررسی میزان اثر بخشی دهانشویه کلر هگزیدین و بیوسید اوژنول بر روی سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک استرپتوکوکهای دهانی انجام شده است.

*مؤلف مسؤول، نشانی: تهران، دانشگاه تهران، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۳۵۵۶

مواد و روشها: از ۲۰ نمونه پلاک دندانی انسانی و بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی، تعدادی جدایه‌های *استرپتوکوکوس ویریدانس* جدا شد. جدایه دارای بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم انتخاب و با استفاده از آنالیز ژن 16SrRNA مورد شناسایی دقیقتر قرار گرفت. میزان اثربخشی غلظتهای مختلف کلرگزیدین با درصد وزنی/حجمی (۰/۲ - ۰/۰۶) و (۹۹ - ۲۹/۷) بر روی رشد سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم این سویه *استرپتوکوک* دهانی به ترتیب به روشهای ماکرودایلوشن براث و میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) این آنتی‌سپتیکها بر روی *استرپتوکوکوس ویریدانس* فوق‌سنجیده شد.

یافته‌ها: جدایه UTMC 2446 که ۹۸/۴۰٪ شباهت به *استرپتوکوک سانزیوس* داشته، بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم را در بین جدایه‌ها داشت. غلظتهای ۰/۲٪ کلرگزیدین و ۹۹٪ اوژنول مانع از تشکیل بیوفیلم در این جدایه شد؛ در حالی که این ترکیبات به ترتیب در غلظتهای ۰/۱۴ و ۰/۰۷۹/۲ به خوبی قادر به مهار رشد سلولهای پلانکتونی بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: برای از بین بردن بیوفیلم *استرپتوکوکهای ویریدانس* به غلظتی بیش از غلظت مورد نیاز برای مهار رشد سلولهای پلانکتونیک آنها نیاز است. همچنین با توجه به اینکه در این پژوهش، غلظتهای موثر کلرگزیدین و اوژنول برای مهار رشد بیوفیلم *استرپتوکوکهای دهانی* معادل حداکثر غلظت این ترکیبات در محصولات تجاری است و نیز با توجه به احتمال بروز سویه‌های مقاوم، اثربخشی محصولات تجاری باید به صورت دوره‌ای پایش شود. نتایج این پژوهش می‌تواند برای بخشهای تولید و کنترل کیفی این محصولات در واحدهای تولید کننده مفید باشد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس های ویریدانس*، بیوفیلم، کلرگزیدین، اوژنول، *استرپتوکوکوس سنگوئینیس*.
مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ دوره ۴۲ / شماره ۱: ۸۶-۷۵.

مقدمه

دستکاری‌های دندانپزشکی و جراحی‌های دندان و لثه ایجاد می‌شود. همچنین این باکتریها از عوامل اصلی مرگ و میر ناشی از عفونت خون، شوک و سندرمهای تنفسی در بیماران نوتروپنی هستند.^(۴) *استرپتوکوکوس موتانس* مهمترین عضو *استرپتوکوکهای ویریدانس* است. از دیگر اعضای این گروه می‌توان *استرپتوکوک سنگوئینیس* را نام برد که بر تشکیل پلاکهای دندانی موثر است. این باکتریها در حفره دهانی افراد سالم یافت شده و می‌تواند شرایط را برای رشد و سکونت میکروارگانیسمهای دیگر عامل عفونتهای دندانی مانند *استرپتوکوک موتانس* فراهم کند. در صورت ورود به خون، این میکروارگانیسمها می‌توانند سبب اندوکاردیت نیز بشوند.^(۵، ۶) به همین دلیل مقابله با این میکروارگانیسمها می‌تواند سبب افزایش کیفیت زندگی و بهبود وضعیت سلامت شود. به این منظور، امروزه مواد ضد میکروبی متفاوتی در بازار عرضه شده است که کاربردهای گوناگونی را در بهداشت دهان

پلاک دندانی شامل بیوفیلم یا توده باکتری‌هایی است که بر سطوح دهان شامل سطح دندان‌ها و لثه رشد می‌کند. این لایه چسبناک ابتدا بیرنگ بوده ولی بعداً به صورت کرمی یا قهوه‌ای رنگ دیده می‌شود.^(۱) تقریباً ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن پلاک از آب تشکیل شده است، ولی ۷۰ درصد وزن خشک آن از باکتریها و بقیه آن از پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است.^(۲) *استرپتوکوکوس‌های گروه ویریدانس* اولین گروه تشکیل دهنده بیوفیلم در دندان هستند.^(۳) این باکتری‌ها شامل یک گروه نامتجانس از گونه‌های *استرپتوکوک* بوده که ساکن طبیعی حفره دهانی و نیز بخش فوقانی دستگاه تنفسی، مجاری گوارشی و واژن هستند. اگر چه این باکتری‌ها معمولاً بیماری‌زایی کمی دارند، ولی با سندرم‌های بالینی مهمی همراه بوده و از عوامل اصلی اندوکاردیت‌های حاد باکتریایی هستند که پس از

مواد و روشها

تعداد ۲۰ نمونه پلاک دندانی از ۲۰ فرد متفاوت با استفاده از سواب استریل برداشته شد و هر کدام به محیط ترانسپورت حاوی PBS در pH ۷/۲ انتقال داده شد و هر کدام از نمونه ها برای جدا سازی استرپتوکوکهای ویریدانس بر روی پلیت حاوی محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck) تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور و اتمسفر ۱۰ درصد CO_2 و در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد.^(۱۰) شناسایی جدایه ها بر اساس آزمونهای استاندارد شامل شکل کلونی، فعالیت همولیتیک، رنگ آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز، رشد در نمک ۶/۵ درصد، هیدرولیز اسکولین، تجزیه قندهای لاکتوز، مانیتول، سوربیتول، رافینوز، اینولین، تست MR-VP و هیدرولیز اوره انجام شد.^(۱۱)

از میان ۱۶ جدایه استرپتوکوک دهانی به دست آمده، دو جدایه که سرعت رشد بیشتری داشتند، جهت بررسی تشکیل بیوفیلم میکروبی انتخاب گردید و آزمونهای بهینه سازی محیط کشت و میزان تلقیح به منظور انتخاب سویه‌ای با توانایی برتر تولید بیوفیلم انجام شد. کلونیهای تک کشت خالص سویه‌های استرپتوکوک‌های ویریدانس جدا شده در محیطهای Mueller Hinton Agar-MHA خون‌دار (Merck) و MHA به علاوه ۰/۵٪ گلوکز و سوکروز (Merck) کشت شد و سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر (OD_{630}) ۰/۱ - ۰/۲ - ۰/۳ تهیه شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محیطهای کشت MHA خون‌دار (Merck) و Mueller Hinton

و دندان و دندانپزشکی دارند.^(۷) با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عوامل ضد میکروبی و درک تغییرات مقاومت میکروارگانیسمهای هدف، در گذر زمان می‌توان به کنترل و درمان بیماریهای پریدونتال و عفونتهای ناشی از آن کمک کرد. کلرگزیدین در سال ۱۹۴۰ در صنایع شیمیایی سلطنتی انگلستان (ICI) در هنگام سنتز ترکیبات ضد مالاریایی کشف شده است. مشتق دی گلوکونات این ترکیب در سال ۱۹۵۴ به عنوان ترکیب آنتی‌سپتیک تجاری موضعی عرضه شده است.^(۸) از آن زمان به بعد کاربردهای بسیار متنوعی از این ترکیب در عرضه ابزارآلات پزشکی مانند صابون، دهان شویه، ایمپلنت، لباسهای یک بار مصرف، کاتتر و ژل روان کننده برای تزریق سوند عرضه شده است. اوژنول یک ترکیب فنیل پروفن و از دسته ترکیبات فنیل پروپانوئیدها است. این ترکیب کمی زرد رنگ و یکی از اسانسهای روغنی گیاهان میخک، دارچین، جوزهندی و برگ بو است. این ترکیب به عنوان عطر، مواد معطره و اسانس روغنی استفاده می‌شود. نمک روی این ترکیب به عنوان ترکیب آنتی‌سپتیک و آرام کننده موضعی درد در پانسمان دندان مورد استفاده قرار می‌گیرد.^(۹)

با توجه به فقدان مطالعات پیشین، هدف این مطالعه، مقایسه میزان اثر بخشی کلرگزیدین و اوژنول به عنوان یکی از پرکاربردترین ترکیبات آنتی‌سپتیک دهانی بر اشکال بیوفیلمی و پلانکتونی سویه‌های استرپتوکوکهای ویریدانس جدا شده از دهان افراد سالم، بود.

محیط کشت جدا شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته و از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست توده منجمد شده با ازت مایع سلولها شکسته شده و DNA آن با روش استخراج با روش فنل- کلروفرم جداسازی شد. تکثیر DNA با پرایمرهای عمومی 9F (AAG AGT TTG ATC ATG) و 1541R (AGG AGG TGA TCC AAC و GCT CAG) (CGC A) انجام شد.^(۱۳) بررسی محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ صورت گرفت. محصول به دست آمده بعد از خالص سازی، در صورت مناسب بودن باندها برای توالی‌یابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند. جهت بررسی اثر مواد ضد میکروبی بر روی سلولهای بیوفیلم، ابتدا رقتهای متوالی از مواد ضد میکروبی مورد آزمون و محیط کشت میکروبی MHB خون‌دار (Merck) تهیه و ۲۵۰ میکرولیتر از این رقتها به صورت دوتایی به چاهکهای میکروپلیت اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۲ در طول موج ۶۵۰ نانومتر به هر چاهک اضافه شد. سایر شرایط ارزیابی تشکیل بیوفیلم مانند آن چه که در بالا گفته شد، بوده است.

به منظور بررسی حداقل غلظت مهارکننده (MIC) مواد ضد میکروبی، درصدهای وزنی/حجمی (۰/۲-۰/۰۶) از کلرهگزیدین (شرکت شهردارو، تهران، ایران) و غلظتهای (۷۹/۲-۰/۹۹) درصد وزنی/حجمی از اوژنول ۹۹٪ (Grodab Chemie, Germany) در محیط MHB خون‌دار تهیه گردید. سپس ۲,۵ میلی‌لیتر از رقتهای تهیه

Broth-MHB به علاوه ۰/۵٪ گلوکز و سوکروز (Merck) در چاهکهای میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استرپتوکوکهای دهانی هر نمونه به هر یک از ۶ چاهک در دو ردیف سه تایی ریخته شد. به عنوان شاهد از ۵۰ میکرولیتر محیط MHB خون‌دار (Merck) و MHB به علاوه ۰/۵٪ گلوکز و سوکروز (Merck) در دو ردیف سه تایی استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. سپس محتویات چاهکها به آرامی تخلیه شده و با سرم فیزیولوژی به آهستگی شستشو داده شد. به منظور تثبیت بیوفیلم تشکیل شده به هر چاهک، ۲۰۰ میکرولیتر متانول خالص افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از تخلیه محتوی چاهک، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰/۵٪ افزوده شد و به مدت بیست دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از تخلیه رنگ و شستشو، اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ حجمی افزوده شد و پس از بیست دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر جذب هر چاهک در طول موج ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید^(۱۲) هر آزمون دوبار تکرار شد. پس از بررسی، سویه مناسب با جذب نوری بالا انتخاب شد.

شناسایی نهایی سویه منتخب دارای توان برتر در تولید بیوفیلم به روش مولکولی با آنالیز ژن 16S rRNA انجام شد. به این منظور جدایه منتخب در محیط BHI broth به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس بیوماس باکتری با سانتریفیوژ از

شده است. براساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی و مورفولوژی، از تعداد ۴۸ جدایه رشد کرده بر روی محیط TSA، ۱۶ جدایه متعلق به استرپتوکوکوس‌های ویردانس و ۳۲ جدایه مربوط به باکتریهای دیگر بوده است. فراواترین جدایه‌های غیراسترپتوکوک ویردانس به ترتیب استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استرپتوکوکهای گروه D، E، coli و دیفتروئیدها بودند.

شده به لوله‌های شیشه‌ای ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۲ به هر لوله اضافه شد. آزمون بر اساس روش میکرودایلوشن براث پروتکل NCCLS انجام پذیرفت.^(۱۴) پس از مواجهه با مواد ضد میکروبی و طی شدن دوره انکوباسیون، وجود سلولهای زنده به روش میکروسکوپی و کشت بر روی محیط Blood Agar بررسی شد.

یافته ها نتایج حاصل از کشت اولیه نمونه‌های دندانی از ۲۰ فرد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده

جدول ۱. نتایج جدایه های کشت نمونه‌های بیوفیلم دندانی بر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار

| کد آزمایشگاهی | جنس | سن (سال) | سویه های تعیین شده با روش‌های شیمیایی به همراه کد آزمایشگاهی سویه | | |
|---------------|-----|----------|---|--|--------------------------------------|
| A | مرد | ۳۵ | <i>Streptococcus mutans</i> A1 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> A2 | <i>Diphtheroid</i> A3 |
| B | مرد | ۳۱ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> B1 | <i>Streptococcus sanguinis</i> B2 | |
| C | مرد | ۳۲ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> C1 | <i>Streptococcus mutans</i> C2 | |
| D | مرد | ۳۵ | <i>Streptococcus mutans</i> D1 | <i>E coli</i> D2 | |
| E | مرد | ۴۰ | <i>E. coli</i> E1 | <i>Streptococcus parasanguinis</i> E2 | |
| F | مرد | ۳۰ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> F1 | <i>Streptococcus group D</i> F2 | <i>E. coli</i> F3 |
| G | مرد | ۳۰ | <i>Streptococcus mutans</i> G1 | <i>Diphtheroid</i> G2 | |
| H | مرد | ۳۲ | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> H1 | <i>Diphtheroid</i> H2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> H3 |
| I | مرد | ۳۲ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> I1 | <i>Streptococcus sanguinis</i> I2 | |
| J | مرد | ۳۹ | <i>Streptococcus mutans</i> J1 | <i>E. coli</i> J2 | <i>Streptococcus group D</i> J3 |
| K | زن | ۳۱ | <i>Streptococcus mutans</i> K1 | <i>Streptococcus group D</i> K2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> K3 |
| L | زن | ۳۲ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> L1 | <i>Streptococcus mutans</i> L2 | |
| M | زن | ۳۰ | <i>Streptococcus sanguinis</i> M1 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> M2 | |
| N | زن | ۳۸ | <i>Streptococcus mutans</i> N1 | <i>Streptococcus parasanguinis</i> N2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> N3 |
| O | زن | ۴۰ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> O1 | <i>Diphtheroid</i> O2 | |
| P | زن | ۴۰ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> P1 | <i>Streptococcus sanguinis</i> P2 | |
| Q | زن | ۳۸ | <i>Staphylococcus epidermidis</i> Q1 | <i>Diphtheroid</i> Q2 | |
| R | زن | ۳۷ | <i>Streptococcus group D</i> R1 | <i>Streptococcus mutans</i> R2 | |
| S | زن | ۳۸ | <i>Streptococcus sanguinis</i> S1 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> S2 | <i>Diphtheroid</i> S3 |

S. parasanguinis و *S. sanguinis* (شامل ۵ جدایه) (شامل ۲ جدایه) طبقه بندی شده‌اند.

در جدول ۲، نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بر روی ۱۶ جدایه استرپتوکوک ویریدانس آورده شده است. این جدایه‌ها در سه گونه *S. mutans* (شامل ۹ جدایه)،

جدول ۲. نتایج آزمونهای بیوشیمیایی ۱۶ جدایه استرپتوکوک ویریدانس

| کد جدایه | نوع همولیز | تجزیه اسکولین | تولید استوتین | تولید اوره آز | لاکتوز | تولید اسید از | | | سویه پیشنهادی |
|----------|------------|---------------|---------------|---------------|--------|---------------|---------|----------|------------------------------------|
| | | | | | | مانیتول | اینولین | سوربیتول | |
| A1 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| B2 | α | + | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| C2 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| D1 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| E2 | α | - | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus parasanguinis</i> |
| G1 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| I2 | α | + | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| J1 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| K1 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| L2 | α | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| M1 | α | + | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| N1 | γ | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| N2 | α | - | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus parasanguinis</i> |
| P2 | α | + | - | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus sanguinis</i> |
| R2 | γ | + | + | - | + | + | + | + | <i>Streptococcus mutans</i> |
| S1 | α | + | + | - | + | - | - | - | <i>Streptococcus sanguinis</i> |

که در جدول ۳ نشان داده شده است، سویه B2 و محیط کشت مولر هیتون برات همراه ۵٪ خون و میزان تلقیح (۰/۲ OD) برای ادامه کار انتخاب شد.

از بین جدایه های مختلف استرپتوکوک ویریدانس، دو جدایه A1 و B2 که سرعت رشد بیشتری داشتند، برای ارزیابی میزان فعالیت بیشتر بیوفیلم انتخاب شدند. با توجه به ارزیابی نتایج آزمونهای توانایی تشکیل بیوفیلم،

جدول ۳. نتایج بهینه سازی میزان تشکیل بیوفیلم بر اساس ترکیب محیط کشت و میزان تلقیح

| انحراف معیار | میزان بیوفیلم (OD) | میزان تلقیح | محیط کشت | سویه منتخب |
|--------------|--------------------|-------------|---|------------|
| ۰,۰۲ | ۰,۵۴۲ | ۰,۱ | Muller Hinton broth + خون ۵٪ | A1 |
| ۰,۰۳ | ۰,۶۹۵ | ۰,۲ | | |
| ۰,۰۴ | ۰,۸۳۵ | ۰,۳ | | |
| ۰,۰۲ | ۰,۳۵۶ | ۰,۱ | Muller Hinton broth + گلوکز و سوکروز ۵٪ | A1 |
| ۰,۰۲ | ۰,۴۲۵ | ۰,۲ | | |
| ۰,۰۳ | ۰,۵۲۳ | ۰,۳ | | |
| ۰,۰۳ | ۰,۶۳۵ | ۰,۱ | Muller Hinton broth + خون ۵٪ | B2 |
| ۰,۰۲ | ۰,۸۴۶ | ۰,۲ | | |
| ۰,۰۴ | ۱,۴۹ | ۰,۳ | | |
| ۰,۰۲ | ۰,۳۷۸ | ۰,۱ | Muller Hinton broth + گلوکز و سوکروز ۵٪ | B2 |
| ۰,۰۲ | ۰,۴۸۰ | ۰,۲ | | |
| ۰,۰۳ | ۰,۵۱۰ | ۰,۳ | | |

2446 در کلکسیون میکروارگانیسمهای دانشگاه تهران نگهداری و ذخیره شده است.

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی دهانشویه کلرهگزیدین بر بیوفیلم و سلولهای پلانکتونی *S. sanguinis* UTMC 2446 در شکل ۱ و جدول ۴ آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می شود حداقل

نتیجه شناسایی مولکولی به روش PCR ژن 16SrRNA بر روی سویه منتخب دارای بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم (B2)، تاییدکننده ویریدانس بودن جدایه بود. بر اساس این نتایج، این سویه متعلق به جنس استرپتوکوکوس بود و بیشترین شباهت (۹۸,۰۴٪) را با گونه *S. sanguinis* داشت. این سویه با کد UTMC

بحث

حقیقی و همکارانش^(۱۶) مقایسه اثرات ضد میکروبی ده گونه گیاهی را با کلرهگزیدین بر علیه *Streptococcus mutans* و *Candida albicans* مقایسه کردند و نشان دادند که عصاره گیاهی تاثیر مناسبی بر باکتریهای مورد آزمایش در مقایسه با دهان شویه کلرهگزیدین دارد.^(۱۶) یاقوتی خراسانی و همکارانش^(۱۵) اثر دو دهانشویه تیمول و کلرهگزیدین را بر علیه *S. mutans* و *S. sanguinis* تهیه شده از کلکسیون میکروبی بررسی کردند که هر دو دهانشویه در حذف باکتریها بخصوص *S. sanguinis* اثر داشته اند. در مطالعات دیگری اثر اوژنول بر بیوفیلم *C. albicans* مورد بررسی قرار گرفته است در این مطالعه اوژنول با غلظت ۵۰۰ mg/l بر بیوفیلم مخمر موثر بوده است.^(۲۷) حسینی و همکاران^(۲۴) اثر عوامل ضد میکروبی بر سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم *S. mutans* جدا شده از نمونه های بالینی را بررسی کردند و نتایج بررسی نشان داد برای ریشه کنی بیوفیلم غلظت ۰/۲ g/100ml از کلرهگزیدین و در مورد سلولهای پلانکتونی غلظت ۰/۹۵ g/100ml مناسب است.^(۲۴) نتایج این تحقیق در مورد سلولهای بیوفیلم استرپتوکوکهای ویریدانس با نتایج تحقیق حاضر منطبق است، اما بر اساس نتایج این پژوهش برای حذف سلولهای پلانکتونی این باکتریها غلظت بالاتری از کلرهگزیدین به نسبت پژوهشهای پیشین مورد نیاز است. همچنین مطالعاتی توسط Didry و همکاران^(۱۹) در خصوص استفاده توام از ماده ضد عفونی کننده اوژنول و آنتی سبتیکهای تیمول و کارواکرول انجام شده که نشان

گزارشهای متعدد نشان می دهد که اوژنول و کلرهگزیدین کارایی مناسبی برای ضد عفونی کردن دندان و جلوگیری از عفونتهای پریدنتال دارند.^(۱۵، ۱۶) در این گزارشها نشان داده شده که تاثیر اوژنول بر استرپتوکوکهای دهانی محدود بوده است. در اغلب پژوهشهای انجام شده اثرات ضد میکروبی بیوسایدها بر روی فرم پلانکتونی استرپتوکوکهای ویریدانس مورد بررسی قرار گرفته است، حال آن شکل پلانکتونی در زندگی میکروبی اهمیت بالینی محدودی دارد و بدن ما در اغلب موارد با سلولهای بیوفیلم میکروبی مواجه است. بی توجهی به این شکل زندگی سبب اختلال در روند پیشگیری و درمان می گردد.^(۱۷) مهمترین یافته پژوهش کنونی این است که جهت ممانعت از رشد *S. sanguinis* در حالت بیوفیلم کلرهگزیدین در غلظت ۰/۲ g/100ml و اوژنول در درجه خلوص ۹۹٪ ضروری است، ولی این ترکیبات بر روی سلولهای پلانکتونی به ترتیب با غلظت ۰/۱۴ g/100ml و ۷۹/۲٪ اثربخش بوده اند. از سوی دیگر اغلب پژوهشهای پیشین بر روی نمونه های کلکسیونی صورت گرفته است.^(۲۳-۱۸ و ۱۵) و پژوهشهای معدودی بر روی سویه های استرپتوکوک ویریدانس بالینی انجام شده است.^(۲۶-۲۴ و ۱۶) با این وجود پژوهشی که در آن اثربخشی این دو ترکیب بر روی سلولهای بیوفیلمی و پلانکتونی با منشاء بالینی مقایسه شود، دیده نشده است.

به علت نفوذ کمتر آنتی بیوتیک در درون بیوفیلم و نیز تغییرات ژنتیکی و متابولیکی و ماتریکس خارج سلولی، سلولهای بیوفیلم مقاومت بیشتری نسبت به مواد ضد میکروبی در مقایسه با سلولهای پلانکتونی دارند.^(۲۳)

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، لزوم دقت در واحدهای کنترل کیفی ترکیبات آنتی سبتیک برای کلرهگزیدین در غلظت $0.2 \text{ g}/100\text{ml}$ و اوژنول در درجه خلوص ۹۹٪ بسیار ضروری به نظر می رسد. اهمیت این نکته با توجه به اینکه این غلظتها، معادل با غلظت این ترکیبات در فرآورده های تجاری است، بیشتر می شود. به عبارت دیگر در صورت بروز یک جهش احتمالی و بروز مقاومت در استرپتوکوکهای دهانی، ترکیبات تجاری حاوی غلظت کمتری برای کشندگی استرپتوکوکهای ویریدانس خواهد بود، که همانگونه که در بالا گفته شد، می تواند سبب بروز مقاومت بیشتر شود. بنابراین پایش مجدد و دوره ای این ترکیبات ضد عفونی کننده از نظر عملکرد و درک میزان مقاومت برای جلوگیری از شیوع عفونت های پریدونتال توصیه می شود. انجام آزمایش و ارزیابی اثر در شرایط بالینی می تواند سبب کارآمدی فراتر نتایج پژوهش کنونی بشود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانمها فائزه الماسی، فهیمه محمدنیا و لیلا پرویزی که نقش شایانی در پیشبرد این مطالعه داشته اند، تقدیر و تشکر می کنند.

داد اوژنول به تنهایی و به صورت توام با این مواد خاصیت ضد عفونی کنندگی خود را حفظ می کند. در مطالعاتی که توسط ابراهیمی کهریز سنگی و همکاران^(۲۸) بر روی اثر کلرهگزیدین بر عفونتهای بیمارستانی انجام شد نتایج نشان داد که استفاده از کلرهگزیدین در غلظتهای مناسب (MIC) می تواند از تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف باکتریهای عامل عفونتهای بیمارستانی جلوگیری کند، اما دوزهایی از کلرهگزیدین که کمتر از MIC هستند می توانند محرک تولید بیوفیلم باشند.

باتوجه به اینکه تاکنون تحقیقی در مورد مقایسه اثر اوژنول بر روی فرم پلانکتونی و بیوفیلم باکتریهای دهانی صورت نگرفته، مقایسه نتایج حاصل با تحقیقات دیگران میسر نمی باشد، زیرا سایر مطالعات انجام شده فقط بر روی فرم پلانکتونی استرپتوکوکهای دهانی بوده است.^(۲۱-۹)

در پژوهش حاضر اثر مهارکنندگی رشد رفتهای مختلف دهان شویه پر کاربرد کلرهگزیدین ۰.۲ درصد و اوژینول خالص که به طور گسترده در دندانپزشکی مورد استفاده قرار می گیرد، بر روی سلولهای بیوفیلم و پلانکتونی *S. sanguinis* مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج حاصل از این مطالعه چنین بر می آید که دهان شویه کلرهگزیدین در غلظت $0.2 \text{ g}/100\text{ml}$ و اوژنول در درجه خلوص ۹۹٪ توانایی مهار رشد سلولهای بیوفیلم *S. sanguinis* را دارند. در حالی که در سلولهای پلانکتونی این باکتری کلرهگزیدین در غلظت $0.2 \text{ g}/100\text{ml}$ و اوژنول در غلظت $0.2/79\%$ توانایی مهار رشد دارد.

منابع

1. Oh J S, Shim J J, Lee K S, Doh J W. Cervical epidural abscess: Rare complication of bacterial endocarditis with *Streptococcus viridans*: A case report. *Korean J Spine* 2015;12(1):22-5.
2. Marsh P, Bradshaw D. Dental plaque as a biofilm. *J Industrial Microbiol* 1995;15(3):169-75.
3. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems 1. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54(1):413-37.
4. Darby ML, Walsh M. *Dental Hygiene: Theory and Practice*. 2nd ed. Philadelphia: W.B, Saunders Co; 2010. P.21-2.
5. Wadström T, Eliasson I, Holder I, Ljungh Å. *Pathogenesis of Wound and Biomaterial-associated Infections*. 1st ed. London: Springer-Verlag; 1990. P. 429-35.
6. Takahashi Y, Takashima E, Shimazu K, Yagishita H, Aoba T, Konishi K. Contribution of sialic acid-binding adhesin to pathogenesis of experimental endocarditis caused by *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun* 2006;74(1):740-3.
7. Mozaffari B, Mansouri S, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi M. In vitro study between antibacterial and cytotoxic effects of chlorhexidine and persica mouthrinses. *J Dent Sch* 2005;23(3):494-509.
8. Lim K, Kam P. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care*. 2008;36(4):502.
9. Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004;30(2):195-203.
10. Wen ZT, Burne RA. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *App Environ Microbiol* 2002;68(3):1196-203.
11. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*: 2nd ed. New York: Springer - Verlag; 2011. P.694.
12. Welch K, Cai Y, Strømme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. *J Function Biomater*. 2012;3(2):418-31.
13. Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht GS. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *J Ssci Eng Tech Mat* 2010;2:3-10.
14. Wikler M. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*. 5th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
15. Yaghooti KM, Assar S, Reza Hosseini O, Assar R S. Comparison of inhibitory dilutions of a thymol-based mouthwash (Orion Ö) with chlorhexidine on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *J Dent Res J (Isfahan)* 2011; 7(2): 122-9.(Persian)
16. Haghghati F, Jafari S, Beyt EJ. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. *Hakim J* 2003; 6(3): 71-6. (Persian)
17. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—implications for health and disease. *BMC Oral Health* 2006;6(1):S14.
18. Sadeghi R, Owlia P, Rezvani M, Taleghani F, Sharif F. An in-vitro comparison between antimicrobial activity of nanosilver and chlorhexidine against *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. *J Islam Dent Assoc Iran* 2011; 23: 225– 31. (Persian)
19. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv* 1994;69(1):25-8.
20. Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J Appl Microbiol*. 1998;84(6):1149-55.
21. Rodríguez Luis O, Sánchez Casas RM, Verde Star MJ, Núñez G, Ríos R, Chávez A. Obtaining the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. *J Oral Res* 2014;3(4):218-24.
22. Adil M, Singh K, Verma PK, Khan AU. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. *J Glob Antimicrob Resist* 2014;2(4):286-92.

23. Prabhakar J, Balagopal S, Priya M, Selvi S, Senthilkumar M. Evaluation of antimicrobial efficacy of Triphala (an Indian Ayurvedic herbal formulation) and 0.2% chlorhexidine against *Streptococcus mutans* biofilm formed on tooth substrate: An in vitro study. *Indian J Dent Res* 2014;25(4):475.
24. Hosseini F, Ghavam Shirazi M, Norouzi J. The effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm strains of *streptococcus mutans* isolated from dental plaque. *Horizon Med Sci* 2011;17(2):5-13.
25. Järvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agent Chem* 1993; 37(5):1158-9.
26. Kulik EM, Waltimo T, Weiger R, Schweizer I, Lenkeit K, Filipuzzi-Jenny E, et al. Development of resistance of mutans streptococci and Porphyromonas gingivalis to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clin Oral Investig* 2015;19(6):1547-53.
27. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2007;163(3):137-43.
28. Ebrahimi KAA, Shabanpour Z, Habibiyan S, Hakimi AR, Hemeati M, Aflakiyan F, et al. Chlorohexidine effect on bacterial biofilms isolated from nasocomial infections. *BJM* 2015; 4(14): 83-92.