Archive of SID

بررسی اثر ضدمیکروبی و ضدبیوفیلم محلول نانونقره در رابطه با میکروارگانیسم های پلاک دندانی در شرایط آزمایشگاهی

صادق خدایی [۱]، رخساره صادقی [۲]، فریال طالقانی [۳]، آرش محبوبی [۴]، مریم طهرانچی [۳]*، امیر شفایی مبارکه [۱]

[۱] دندانپزشک، تهران، ایران

[۲] دانشیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[۴] دانشیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۹۸/۹/۲ – تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱۷

In Vitro Assessment of Anti-Bacterial and Anti-Biofilm Effects of Nanosilver Solution on Dental Plaque Microorganisms

Sadegh Khodaee [1], Rokhsareh Sadeghi [2], Ferial Taleghani [3], Arash Mahboubi [4], Maryam Tehranchi [3]*, Amir Shafaei Mobarakeh [1]

[1] Dentist, Tehran, Iran

[2] Associate Professor, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Periodontology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

[4] Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutics, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 23 November 2019; Accepted: 7 March 2020

Introduction: Nanosilver particles have the potential to serve as bactericidal agent because of the antimicrobial influences of silver ion. This *in vitro* study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm properties of nanosilver against two dental plaque microorganisms, namely Streptococcus mutans (Sm) and Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa).

Materials and Methods: Initially, growth inhibition zone test was performed in brain heart infusion agar medium using Cup-plate method. Subsequently, microdilution method was utilized to determine the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimal Bactericidal Concentrations (MBC). Furthermore, the kinetics of bacterial death was assessed by the Time-Kill Test in different time points (i.e., 30, 60, and 120 sec, as well as 5 min). In addition, the effect of these microorganisms was investigated on the formation of the bacterial biofilms using the tissue Culture Plate Method (TCP).

Results: The results of the t-test indicated that chlorhexidine (120 µg/ml) and nanosilver (200 µg/ml) had the same antimicrobial effect on S m, whereas chlorhexidine was more effective against Aa (P<0.0001). The MIC and MBC of silver nanoparticles were 3.90 and 3.90 µg/ml for Sm and 6.5 and 13.01 µg/ml for Aa. The kinetics of bacterial death evaluation demonstrated that in both tested bacteria, the antimicrobial agents were able to reduce microorganism populations regarding 6 algorithmic cycles significantly after 30 sec of the contact with the antibacterial agent. The t-test statistical analysis showed no significant difference between nanosilver and chlorhexidine groups regarding the biofilm decreasing percentage for Sm and Aa (P>0.05).

Conclusion: Nanosilver had rapid and significant antibacterial effects against dental plaque microorganisms. It is also very effective in inhibiting biofilm formation in two bacterial species in *in vitro* condition.

Keywords: Biofilm Formation, Kinetics of Death, Minimal Bactericidal Concentration, Minimal Inhibitory Concentration, Mouth Rinse, Nanosilver

Corresponding Author: m.tehranchi@shahed.ac.ir

J Mash Dent Sch 2020; 44(2): 114-26 .

چکیده

مقدمه: ذرات نانونقره به سبب اثرات ضدمیکروبی یون نقره، پتانسیل کاربرد به عنوان عامل ضدمیکروبی را دارا می باشد. هدف از مطالعه ی آزمایشگاهی حاضر، ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم نانونقره در برابر دو میکروارگانیسم پلاک دندانی، استرپتوکوکوس موتانس و اگریگاتیباکتراکتینومیست کومیتنس (Aa) بود.

---

* مولف مسؤول، نشانی: تهران. دانشگاه شاهد، دانشکده دندانپزشکی، ۰۹۱۲۱۰۷۱۹۹۲

E-mail: m.tehranchi@shahed.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها: ابتدا تست هاله عدم رشد در محیط Brain heart infusion agar با روش Cup plate انجام شد. سپس حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده ی باکتری (MBC) با استفاده از روش میکرودیلوشن تعیین شد. کینتیک مرگ باکتری با استفاده از Time-Kill Test در زمان های مختلف ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ ثانیه و ۵ دقیقه تعیین شد. هم چنین اثر این دو ماده در ممانعت از تشکیل بیوفیلم دو سویه باکتریایی با استفاده از روش Tissue Culture Plate (TCP) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با آزمون های *t* مستقل و من-ویتنی انجام شد.

یافته‌ها: مقایسه عملکرد ضد میکروبی دو ماده براساس آزمون *t* نشان داد که در غلظت ۲۰۰ µg/ml نانوسیلور و ۱۲۰ µg/ml کلرهگزیدین هر دو ماده اثر مشابهی روی استرپتوکوکوس موتانس دارند و در مورد اگریگاتیباکتراکتینومیست کومیتنس، کلرهگزیدین موثرتر بوده است (*P*<۰/۰۰۰۱). MIC و MBC ذرات نانونقره برای استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۳/۹ µg/ml و ۳/۹ و برای اگریگاتیباکتراکتینومیست کومیتنس ۶/۵ µg/ml و ۱۳/۰۱ بدست آمد. ارزیابی کینتیک مرگ نشان داد که در هر دو باکتری مورد مطالعه، عامل ضد میکروبی قادر به کاهش سریع جمعیت میکروارگانیسم های زنده به میزان ۶ سیکل لگاریتمی بعد از ۳۰ ثانیه تماس با عامل ضدمیکروبی بود. بررسی های آماری نشان داد درصد کاهش بیوفیلم برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس و اگریگاتیباکتراکتینومیست کومیتنس در گروه مواجهه با نانوسیلور نسبت به کلرهگزیدین تفاوت معنی داری نداشت (*P*>۰/۰۵) .

نتیجه گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که نانونقره اثرات آنتی باکتریال معناداری با شروع اثر سریع بر میکروارگانیسم های پلاک دندانی دارد. هم چنین، باعث کاهش تشکیل بیوفیلم هر دو گونه باکتری مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی می شود.

کلمات کلیدی: نانونقره، دهانشویه، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، حداقل غلظت کشندگی باکتری، کینتیک مرگ، تشکیل بیوفیلم

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۹ دوره ۴۴ / شماره ۲ : ۲۶-۱۱۴ .

مقدمه

تحقیقات در زمینه های مختلف دندانپزشکی نقش پلاک دندانی را به عنوان فاکتور اصلی تکامل و تداوم بیماری پریودنتال نشان داده است. اطلاعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که ارتباط نزدیکی بین تخریب پریودنتال و پلاک دندانی وجود دارد.[۱] پلاک دندانی به گونه ای طبیعی بر سطح دندان ها تشکیل می شود و برداشت موثر آن به روش مکانیکی امری ضروری جهت نگهداری سلامت پریودنتال است. مسواک زدن به همراه خمیر دندان، کاربردی ترین و مفیدترین روش برای مهار پلاک فوق لثه ای در بیشتر بیماران است.[۲]

تحقیقات مختلف نشان داده است که هیچ کدام از روش های مختلف مسواک زدن منجر به برداشت کامل پلاک میکروبی نمی شوند.[۳] روش مکانیکی برداشتن پلاک صددرصد موثر نیست و نیز برخی بیماران در پذیرفتن و پایبندی به آن مشکل دارند، همچنین در بیمارانی که جراحی شده اند، امکان استفاده از روش مکانیکی تا مدتی بعد از جراحی فراهم نیست[۴و۵]؛ بنابراین به کار گرفتن عوامل جانبی ایمن و موثر در مهار پلاک، منطقی به نظر می رسد.[۴و۶] استفاده از روشهای کنترل شیمیایی پلاک به منظور برداشتن رسوبات میکروبی از سطوح دهانی یا جلوگیری از تشکیل آن و یا تسهیل برداشته شدن آن توسط روش های مکانیکی می باشد. مواد شیمیایی به روش های مختلفی مانند دهانشویه ها، خمیردندان ها، ژل ها، اسپری ها، شستشودهنده ها و قرص های مکیدنی تجویز می شوند مصرف دهانشویه متداول ترین روش کنترل پلاک شیمیایی می باشد.[۷] خاصیت ضد پلاک دهانشویه ها از طریق اثر باکتریوسیدال، باکتریواستاتیک، جدا کردن میکروارگانیسم ها از سطوح دندانی یا سست کردن اتصال آن ها به این سطوح و یا پایین آوردن کشش سطحی دندان انجام می شود.[۸]

از میان دهانشویه های مختلف، کلرهگزیدین به عنوان استاندارد طلایی دهانشویه های ضد پلاک شناخته می شود.[۹] این محلول یک ضدعفونی کننده ی وسیع

www.SID.ir

Archive of SID

الطیف است که در مقابل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، باکتری های بی هوازی، قارچ ها، مخمرها و نیز برخی ویروس ها نظیر HIV، HBV فعال است، ولی استفاده ی طولانی مدت از آن به علت عوارضی مانند افزایش تشکیل جرم، ایجاد تغییر رنگ دندان ها و رستوریشن ها و نیز تغییر حس چشایی محدود شده است.[۱۰]

نقره و مشتقات آن قدیمی ترین مواد ضد میکروبی هستند که در پزشکی استفاده می شوند.[۱۱] مشتقات حاوی نقره جهت کاربرد به عنوان دهانشویه به سبب رسوب بر روی دندان، به لحاظ زیبایی مناسب نیستند، هم چنین به تدریج رسوب می کنند و این رسوب، خواص ضد میکروبی نقره را کاهش می دهد. ولی نانو پارتیکل های نقره در محلول پایدار هستند و خصوصیات ضد میکروبی آن ها می تواند برای سال ها باقی بماند.[۱۲] مطالعات متعدد اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را بر علیه باکتری های دهانی نشان داده اند.[۲۱-۱۳]

استرپتوکوکوس موتانس (S.m) باکتری شاخص دهانی است که در تشکیل پلاک دندانی نقش مهمی دارد. این گونه باکتری از طریق متابولیزه کردن کربوهیدرات های مختلف، محیط اسیدی ایجاد می کند.[۲۲] مطالعات متعدد نشان داده اند که باکتری اگریگاتیباکتر اکتینومیست کومیتنس (A.a) ارتباط تنگاتنگی با ایجاد پریودنتیت دارد. این باکتری با تولید عوامل سرکوب کننده یا متوقف کننده کموتاکسی نوتروفیل ها، سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار می دهد. پروتئین های سطحی Aa با تحریک آزادسازی طیف وسیعی از سایتوکاین ها، محرک بالقوه ای برای تحلیل و تخریب استخوان هستند.[۲۳و۲۴] از آنجایی که پوسیدگی های دندانی و پریودنتیت در نتیجه تشکیل بیوفیلم میکروارگانیسم های دهانی از معضلات مهم سلامت دهان و دندان به شمار می رود و همانطور که گفته شد کلرهگزیدین دارای عوارض جانبی متعددی است، هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضد میکروبی محلول حاوی ذرات نانونقره و مقایسه آن با کلرهگزیدین علیه دو باکتری ذکر شده بود.

مواد و روشها

این پژوهش تجربی و از نوع بنیادی-کاربردی بود که در آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

نانو نقره مورد استفاده در این مطالعه از شرکت نانو نصب پارس (Nano Nasb Pars) و به صورت محلول کلوئیدال آبی با غلظت ٤٠٠٠ ppm و سایز ذرات٤٠-١٠ nm (متوسط ۱۸ نانومتر) بود. برای انجام تست ها، با استفاده از آب مقطر استریل محلول ppm ۲۰۰۰ یا ۰/۲ درصد نانونقره و سایر رقتهای مورد نیاز از آن تهیه شد. محلول کلرهگزیدین مورد استفاده در این مطالعه از شرکت داروسازی دنیای بهداشت (Hexodine 0/12% mouthwash, Donyaye Behdasht Co. Tehran, Iran) تهیه و دارای غلظت ۰/۱۲ درصد بود و رقتهای مورد نیاز از آن با افزودن آب مقطر استریل به آن تهیه گردید.

باکتری های مورد بررسی در این مطالعه عبارت بودند از استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 35608) و Aggregatibacter Actinomycetem Comitans (ATCC43718) که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران فراهم شد. برای فعال کردن باکتری ها پس از تلقیح در محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Merck, Germany)، ٢٤ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. برای تهیه ی سوسپانسیون میکروبی از کشت ٢٤ ساعته استفاده گردید.

ارزیابی اثر ضد باکتریایی نانونقره و کلرهگزیدین با استفاده از روش Cup- plate از کشت بیست و چهار ساعته

www.SID.ir

Archive of SID

میکروارگانیزمها، سوسپانسیون سالین-باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند با تنظیم جذب در ٦٢٥ نانومتر با شمارش میکروبی 1.5×10^8 CFU/ml آماده گردید. پس از آماده سازی سوسپانسیون میکروبی برای هر نوع باکتری، میکروارگانیسمها در سطح محیط کشت Brain Heart Infusion Agar (BHIA) با استفاده از سواب و به شکل چمنی کشت داده شدند. سپس چاهک هایی با قطر ٦ میلی متر در درون محیط کشت ایجاد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کلرهگزیدین با غلظتهای Mg/ml ۱۲۰، ۱۲، ۱/۲ و ۰/۱۲ و یا محلول نانونقره با غلظتهای ۲۰۰، ۲۰، ۲ و ۰/۲ به درون هر چاهک منتقل شدند. تمام پلیت ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شدند. مراحل بیان شده برای هر باکتری سه بار تکرار گردید. بعد از آن قطر هاله مهار رشد به میلی متر ثبت و بصورت میانگین گزارش شد.

حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) به صورت حداقل غلظتی از محلول نانونقره که از رشد قابل مشاهده ی باکتری جلوگیری می کند، تعریف می شود. به منظور تعیین MIC دهانشویه ی کلرهگزیدین و محلول نانونقره از روش Microdilution بر اساس استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute، استفاده شد.[۲۵] بدین منظور از پلیتهای ۹٦ خانه و محیط Brain Heart Infusion Broth Medium (BHIBM) (Merck, Germany) استفاده گردید. در هر چاهک نهایتا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بعلاوه میکروارگانیزم و غلظت متناسب از کلرهگزیدین و یا نانو نقره اضافه گردید. چاهک حاوی محلول نانونقره/کلرهگزیدین و محیط کشت به عنوان کنترل منفی (بدون میکروارگانیسم) و چاهک حاوی محیط کشت و سوسپانسون میکروبی به عنوان کنترل مثبت (بدون محلول نانونقره/کلرهگزیدین) در نظر گرفته شد. میکرو پلیت ها در ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. این تست برای هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد.

حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) عبارت است از کمترین غلظت یک ماده ی ضدمیکروبی که قادر است ۹۹ درصد از یک میکروارگانیسم خاص را از بین ببرد. برای محاسبه ی حداقل غلظت باکتری کشی دهانشویه ی نانونقره و کلرهگزیدین، ۲۰ میکرولیتر از چاهکی که به عنوان MIC انتخاب شده است و از تمامی چاهکهای ماقبل آن که فاقد رشد قابل مشاهده بودند، برداشته و به پلیت های حاوی BHIA مورد انکوباسیون به شکل اسپات منتقل گردید. سپس بعد از نگهداری به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی گراد، وجود رشد میکروارگانیسم ها بررسی گردید. کمترین غلظتی از ماده ی ضدمیکروبی که در آن رشد و تشکیل کلنی از آن مشاهده نگردید، به عنوان حداقل غلظت کشنده ی باکتری در نظر گرفته می شود.[۲۵] هر تست سه بار تکرار شد.

به منظور بررسی کینتیک مرگ باکتریهای مورد بررسی در برابر محلول نانونقره و کلرهگزیدین در زمانهای مختلف مجاورت از ۳۰ ثانیه تا ۱۰ دقیقه، از محلول خنثی کننده کازئین پپتون لسیتین پلی سوربات استفاده شد تا اثر میکروب کشی این مواد را در زمان مورد نظر خنثی نماید.

برای آماده سازی ۱ لیتر از این ماده، ۲۵ گرم از پودر حاوی کازئین پپتون لسیتین پلی سوربات در ۰/۹٦ لیتر آب مقطر حل شد و با ٤۰ میلی لیتر از پلی سوربات به خوبی مخلوط گردید، سپس ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد.

برای بررسی اثر خنثی کنندگی برای هر سوش باکتریایی کمتر از ۱۰۰CFU از باکتری به محلول نانو نقره ویا کلر هگزیدین حاوی خنثی کننده (به نسبت یک به ده)، اضافه شد، سپس نمونه گیری در زمانهای تعیین شده از لوله ها

www.SID.ir

Archive of SID

انجام و پلیت ریزی به صورت مستقیم و رقیق شده به نسبت ۱ به ۱۰ به صورت دوبلیکیت با Brain Heart Infusion Agar (BHIA) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۲٤ ساعت صورت گرفت و سپس شمارش انجام شد. به عنوان کنترل از محلول نرمال سالین بجای نانو نقره و یا کلرهگزیدین استفاده گردید. معیار تعیین اثر خنثی کنندگی، عدم تفاوت در شمارش کلونی در پلیت های نمونه و کنترل در مجاورت خنثی کننده در نظر گرفته شد. پس از تایید اثر محلول خنثی کننده، روند بررسی اثر کشندگی در زمان یا Time-Kill Test به صورت زیر انجام پذیرفت:

از هر یک از میکرو ارگانیزمهای مورد بررسی سوسپانسیون میکروبی با شمارش 10^7 CFU/ml تهیه شد. سپس سوسپانسیون میکروبی با محلول نانونقره و یا کلرهگزیدین مخلوط شد. یک میلی لیتر از این مخلوط در زمان های مشخص ۳۰ ثانیه و ۱، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه برداشته و به ۹ میلی لیتر خنثی کننده (کازئین-پپتین، لسیتین، پلی سوربات) اضافه گردید. از این لوله یک میلی لیتر برداشته شده در محیط BHIA کشت داده شد و برای ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد از این زمان میکروارگانیسم ها در هر پلیت شمارش گردیده و روند مرگ میکروارگانیسم ها تعیین گردید. از نرمال سالین بجای محلول حاوی آنتی باکتریال بعنوان کنترل استفاده گردید.

جهت بررسی اثر دهانشویه ی نانونقره در تولید بیوفیلم با استفاده از Tissue culture plate method (TCP)، مقدار ۱۹۰µl از هر یک از محیط کشتهای تهیه شده به شرح ذیل در چاهک های پلیت ۹٦ چاهکی (SPL ، South Korea) از جنس پلی استایرن ریخته شد. در چاهک اول محیط کشت بدون دهانشویه که همان شاهد مثبت است، ریخته شد. در چاهک دوم از محیط کشت حاوی غلظت MIC ۰/۵ (نصف غلظت MIC) دهان شویه ریخته شد. در چاهک سوم از محیط کشت حاوی غلظت ۱MIC (برابر غلظت MIC) دهان شویه ریخته شد و در چاهک چهارم از محیط کشت حاوی غلظت MIC ۲ (۲ برابر غلضت MIC) دهان شویه ریخته شد.

در چاهک پنجم از محیط کشت بدون دهانشویه و بدون سوسپانسیون باکتری که شاهد منفی است، ریخته شد. این مراحل برای هر دو محلول نانونقره و کلرهگزیدین انجام گردید.

سپس مقدار ۱۰µl از سوسپانسیون تازه باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند[۲٦] به چاهک های یک تا چهارم اضافه و در چاهک پنجم بجای سوسپانسیون باکتری، آب مقطر استریل اضافه شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوباسیون انجام گردید. بعد از ۲٤ ساعت پلیت را از انکوباتور برداشته و کار را زیر هود استریل ادامه داده شد، بدین صورت که محتویات داخل چاهک خالی شده و سه بار چاهک هایی که محتوی سوسپانسیون و محیط کشت و حتی محیط کشت بدون سوسپانسیون بودند، با آب مقطر شسته شدند. در این مرحله باکتری در دیواره پلیت می تواند بیوفیلم تشکیل داده باشد، به جز در چاهک پنجم که سوسپانسیون باکتری ندارد. سپس مقدار ۲۰۰µl از محلول ۰/۰۲۵ درصد سافرانین به مدت دو دقیقه به هر یک از چاهک ها اضافه شد.

در این مرحله بیوفیلم های تشکیل شده به خود رنگ میگیرند. بعد از ۲ دقیقه سافرانین خالی شد و سه بار با آب مقطر شسته شد. سپس مقدار ۲۰۰µl از محلول اتانول-استون (۵۰/۵۰) به مدت ۱۵دقیقه به هر چاهک اضافه شد. در این مرحله رنگ های سافرانین که وارد بیوفیلم شده بودند، آزاد می شدند و بعد در دستگاه الایزا (Convergent) EL-Reader 96x Germany با طول موج

www.SID.ir

Archive of SID

۴۹۲ nm خوانده می شدند. بدین صورت که هر چه بیوفیلم بیشتر تشکیل شود، مقدار بیشتری رنگ به خود جذب کرده و پس از اضافه کردن الکل استون، رنگ بیشتری نیز تولید می کند و نهایتا جذب بیشتری در دستگاه الایزا ثبت می گردد. همچنین به منظور محاسبه ی توان نانوسیلور برای کشتن سلول های بیوفیلم از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{Reduction Percent} = \left[\frac{(c-b)-(t-b)}{(c-b)}\right] \times 100$$

که b نشان دهنده OD برای چاهک های کنترل مثبت، c نشان دهنده OD برای چاهک های کنترل منفی و t نشان دهنده OD چاهک های قرار گرفته در معرض دهانشویه است.[۲۷]

از نرم افزار آماری SPSS جهت آنالیز آماری داده ها استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون تی و یا Mann–Whitney U صورت گرفت. سطح معنی داری در آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه ارزیابی اولیه ی اثرات ضدباکتریایی محلول نانو نقره و کلرهگزیدین با استفاده از روش Cup-plate انجام شد. عدم رشد در غلظتهای µg/ml ۲۰۰، ۲۰ نانو نقره به ترتیب با دامنه ۲۷/۳±۰/۵۷ و ۲۰/۷±۰/٤٦ میلی متر برای استرپتوکوکوس موتانس و عدم رشد در غلظت های مشابه برای باکتری Aa به ترتیب با دامنه ۲٦/۱±۰/۱۷ و ۱۷/۲±۰/۲۲ میلی متر مشاهده شد. در مورد کلرهگزیدین عدم رشددر غلظتهای µg/ml ۱۲۰ و ۱۲ با دامنه ۲٦/۷±۰/۸۷ تا ۱۵/۲±۰/۲۸ میلی متر در باکتری استرپتوکوکوس موتانس مشاهده شد. همچنین برای باکتری Aa در دو غلظت ۱۲۰ و ۱۲ به ترتیب میانگین عدم رشد برابر ۲۸/۱±۰/۱۷ تا ۱٤/۱±۰/۱٦ میلی متر بدست آمد (جدول ۱ و ۲).

نتایج آزمون t نشان داد، که در غلظت µg/ml ۲۰۰ نانوسیلور و µg/ml ۱۲۰ کلرهگزیدین هر دو ماده اثر مشابهی روی استرپتوکوکوس موتانس دارند و در مورد استرپتوکوکوس موتانس کلرهگزیدین موثرتر بوده است ($P< ۰/۰۰۰۱$).

جدول ۱ : میانگین و انحراف معیار قطر هاله ی عدم رشد برحسب میلی متر در مورد باکتری های مورد مطالعه در غلظت های مختلف محلول نانونقره (µg/ml)

غلظت نانو نقره	S.mutans (Mean±SD)	Aa (Mean±SD)	*P*-value
۲۰۰	۲۷/۳ ± ۰/۵۷	۲٦/۰۱ ± ۰/۱۷	>۰/۰۵
۲۰	۲۰/۷ ± ۰/٤٦	۱۷/۰۲ ± ۰/۲۲	>۰/۰۵
۲	۰	۰	–
۰/۲	۰	۰	–

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ : میانگین و انحراف معیار قطر هاله ی عدم رشد برحسب میلی متر در مورد باکتری های مورد مطالعه در غلظت های مختلف محلول کلرهگزیدین (µg/ml)

غلظت کلرهگزیدین	S.mutans (Mean±SD)	Aa (Mean±SD)	P-value
۱۲۰	۲۶/۰۷ ± ۰/۸۷	۲۸/۰۱ ± ۰/۱۷	*۰/۰۰۰۰
۱۲	۱۵/۲ ± ۰/۲۸	۱۴/۰۱ ± ۰/۱۶	<۰/۰۰۱
۱/۲	۰	۰	–
۰/۱۲	۰	۰	–

تعیین MIC با استفاده از روش میکرودیلوشن انجام شد.

یافته ها نشان داد میزان MIC ذرات نانونقره و دهانشویه کلرهگزیدین برای باکتری S.m، ۳/۹۰ µg/ml و ۷/۸۰ µg/ml و برای باکتری A.a، ۶/۵۰ µg/ml و ۲/۳۴ µg/ml بود. MBC ذرات نانونقره و دهانشویه ی کلرهگزیدین برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس ۳/۹۰ µg/ml و ۹/۳۷ µg/ml و برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس ۱۳/۰۱ µg/ml و ۳/۱۲ µg/ml بود.

نتایج آزمایش اعتبارسنجی محلول خنثی کننده (کازئین پپتون لسیتین پلی سوربات) نشان داد که تفاوتی درتعداد کلونی در پلیتهای نمونه و کنترل در مجاورت خنثی کننده وجود نداشت، به عبارت دیگر این محلول، محلول نانونقره و دهانشویه ی کلرهگزیدین را خنثی می کرد.

نتیجه آزمایش کینتیک مرگ که تعداد کلنی باقیمانده ی دو گونه میکروبی مورد بررسی پس از قرار گیری در مجاورت محلولها در زمانهای مختلف ۳۰ ثانیه تا ۱۰ دقیقه را نشان می دهد در جدول ۳ آمده است. همانطور که مشاهده می شود حتی در کمترین زمان مجاورت (سی ثانیه) تعداد میکروارگانیزم ۶ سیکل لگاریتمی کاهش یافته است که می تواند بیانگر اثر خوب و سریع فرمولاسیون مورد نظر باشد.

نتایج مربوط به درصد کاهش تشکیل بیوفیلم در غلظت های مختلف محلول نانونقره در جدول ٤ و نتایج مربوط به درصد کاهش تشکیل بیوفیلم در غلظت های مختلف دهانشویه ی کلرهگزیدین در جدول ۵ آورده شده است. محلول نانونقره موفق به کاهش تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس به میزان ۸۰/٦ درصد و ۹۸/٤ درصد و ۱۰۰ درصد و کاهش تشکیل بیوفیلم آگریگاتیباکتر اکتینومیست کومیتنس به میزان ۷۰/۲ درصد و ۸٤/٦ درصد و ۱۰۰ درصد به ترتیب در غلظت های MIC ۰/۵ و MIC ۱ و MIC ۲ شد (جدول ٤).

دهانشویه ی کلرهگزیدین میزان تشکیل بیوفیلم باکتری S.m را به میزان ۷۸/٤ درصد و ۸٤/٦ درصد و ۸۸/۲ درصد و کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری A.a را به میزان ۵۸/٦ درصد و ۷۰/۲ درصد و ۷۲/٤ درصد به ترتیب در غلظت های MIC ۰/۵ و MIC ۱ و MIC ۲ سبب شد. باکتری A.a کمترین میزان کاهش تشکیل بیوفیلم را در مقابل دهانشویه کلر هگزیدین نشان داد. میزان مهار تشکیل بیوفیلم متناسب با غلظت دهانشویه ی کلرهگزیدین بود (جدول ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ : آزمایش کینتیک مرگ، تعداد کلنی باقیمانده ی دو گونه میکروبی مورد بررسی پس از قرار گیری در مجاورت محلولها در زمانهای مختلف ۳۰ ثانیه تا ۱۰ دقیقه

Micro organisms	Materials	Time					
		30 sec	1 min	2 min	3 min	5 min	10 min
S. mutans	Nano silver	۳	۰	۰	۰	۰	۰
	CHX	۳	۰	۰	۰	۰	۰
A. actinomycetemcomitans	Nano silver	۵	۰	۰	۰	۰	۰
	CHX	۲	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ٤ : درصد کاهش تشکیل بیوفیلم میکروارگانیسم های مورد مطالعه در غلظت های مختلف محلول نانونقره

میکروارگانیسم	غلظت ها (درصد)		
	۰/۵ MIC	۱ MIC	۲ MIC
S. mutans	۸۰/٦	۹۸/٤	۱۰۰/۰
A. actinomycetemcomitans	۷۰/۲	۸٤/٦	۱۰۰/۰

جدول ۵ : درصد کاهش تشکیل بیوفیلم میکروارگانیسم های مورد مطالعه در غلظت های مختلف دهانشویه ی کلرهگزیدین

میکروارگانیسم	غلظت ها (درصد)		
	۰/۵ MIC	۱ MIC	۲ MIC
S. mutans	۷۸/٤	۸٤/٦	۸۸/۲
A. actinomycetemcomitans	۵۸/٦	۷۰/۲	۷۲/٤

بررسی های آماری با استفاده از آزمون t نشان داد برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس درصد کاهش بیوفیلم در گروه مواجهه با نانوسیلور نسبت به کلرهگزیدین تفاوت معنی داری نداشت، اگرچه درصد کاهش بیوفیلم در گروه مواجهه با نانوسیلور بیشتر بود (P=۰/۲۷٤). همچنین برای باکتری A.a درصد کاهش بیوفیلم در گروه مواجهه با نانوسیلور نسبت به کلرهگزیدین تفاوت معنی داری نداشت اگرچه درصد کاهش بیوفیلم در گروه مواجهه با نانوسیلور بیشتر بود (P=۰/۱٦۱).

بحث

نتایج مطالعه ی ما نشان داد که نانوذرات نقره، بر روی هر دو گونه ی باکتری مورد مطالعه، اثر ضدمیکروبی دارد. نانوذرات نقره در غلظت های پایین تر نسبت به کلرهگزیدین اثر مهاری بهتری روی هر دو باکتری نشان دادند. فقط در غلظت µg/ml ۲۰۰ نانوسیلور نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

کلرهگزیدین µg/ml ۱۲۰ اثر ضعیف تری روی باکتری Aa نشان داد.

Hernández Sierra و همکاران[۱۵] نیز در یک مطالعه ی آزمایشگاهی، اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را بر روی استرپتوکوکوس موتانس بررسی کردند. مقادیر MIC و MBC برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۲/۷۱ و ٤/٨٦ و µg/ml ٦/۲۵ بدست آمد که بسیار نزدیک به یافته های مطالعه ی ما می باشد.

فتاحی دولت آبادی و همکاران[۱۹] نیز به بررسی تاثیر نانوپارتیکل های نقره ای که در دهانشویه ی با و بدون الکل به کار رفته بودند؛ پرداختند. در این مطالعه باکتری های Streptococcus mutans، Staphylococcus aureus، Escherichia coli، Pseudomonas aeruginosa و Candida albicans مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دهانشویه حاوی نانونقره در MIC و غلظت های پایین تر کل میکروارگانیسم ها را از بین می برد. مقادیر MIC و MBC برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس µg/ml ۳/۱۲ و µg/ml ٦/۲۵ بدست آمد که قابل مقایسه با یافته های مطالعه ی ما می باشد.

احراری و همکاران[۲۰] نیز در مطالعه ای نشان دادند که نانوذرات نقره دارای تاثیرات ضدمیکروبی موثری بر روی استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سنگوئیس هستند. مقادیر MIC و MBC برای سنگوئیس µg/ml ۰/۰۹۷٦ و µg/ml ۰/۱۳۰۲ و برای موتانس به ترتیب µg/ml ۲۵ و µg/ml ۲۵ بدست آمد. در این مطالعه نیز، سایز ذرات نانونقره و نیز غلظت آن با مطالعه ی ما متفاوت بود. با این حال مشابه مطالعه ی ما، نانونقره در غلظت های پایین تری نسبت به کلرهگزیدین باعث از بین رفتن میکروارگانیسم های مورد مطالعه شد.

A.a پاتوژن پریودنتال بسیار مهمی است که با وجود خصوصیات ویرولانس قوی شناخته شده آن باعث ایجاد بیماری پریودنتال می شود. کشف باکتری A.a تکامل طرح درمان بهتر برای بیماران با پریودنتیت مهاجم را تسهیل می سازد.[۲۸] به هر حال فعالیت آنتی میکروبیال نانوپارتیکل های نقره بر علیه باکتری A.a بسیار کم ارزیابی شده است.[۱۳]

Lu و همکاران[۱۳] در مطالعه ای که فعالیت آنتی میکروبی وابسته به سایز نانوپارتیکل های نقره را بر علیه باکتریهای پاتوژن بی هوازی دهانی بررسی کرده بودند، نشان دادند که مقدار MIC نقره، در اندازه nm-۵ بر علیه باکتری A.a، µg/ml ۲۵ بود. این مطالعه نشان داد که باکتریهای هوازی نسبت به بی هوازی به نانوپارتیکل های نقره حساس تر هستند و نقره با سایز nm-۵ بیشترین فعالیت ضد میکروبی را دارد.

در مطالعه Vargas-Reus[۲۹]، MIC و MBC نانوسیلور با ابعاد nm ۱۰-۵۰ در رابطه با باکتری Aa، µg/ml ۱۰۰ گزارش شده است.

نکته ای که در مورد نانوذرات نقره باید بدان توجه شود این است که علت اینکه مقادیر MIC و MBC به دست آمده از مطالعات مختلف با همدیگر متفاوتند، به خاطر تفاوت در اندازه و مورفولوژی نانوذرات به کار رفته و نیز نوع ترکیب سورفاکتانت و پایدارکننده ای است که می توانند بر خاصیت ضد میکروبی آن موثر باشد. اثر باکتریوسیدال ذرات نانونقره، وابسته به سایز است و هرچه ذرات کوچکتر باشند به دلیل افزایش سطح تماس، اثر آنتی باکتریایی آنها افزایش می یابد.[۳۰] در ضمن نشان داده شد که علاوه بر اندازه، مورفولوژی ذرات (کروی، مثلثی و میله ای) نیز بر خواص ضدمیکروبی آن ها موثر هستند.[۳۰] به طور کلی نتیجه گیری مطالعات ذکر شده، مشابه یافته های مطالعه ی

www.SID.ir

Archive of SID

ماست که نشان می دهد، نانوذرات نقره دارای اثرات ضدمیکروبی هستند. در مطالعات فوق از روش ارزیابی هاله ی عدم رشد و یا تعیین MIC و MBC برای ارزیابی اثرات ضدمیکروبی استفاده شده است. ارزیابی هاله ی عدم رشد، روشی سریع و کیفی برای اندازه گیری توانایی ماده ی ضدمیکروبی در مهار رشد میکروارگانیسم ها است. مقدار نفوذ ماده ی ضد میکروبی در آگار به ماهیت ماده بستگی دارد و از عوامل موثر بر نتیجه ی روش چاهک-پلیت است. همچنین این روش، بیشتر برای تعیین مقاومت یا حساس بودن میکروارگانیسم نسبت به ماده ی ضدمیکروبی به کار می رود و نمی تواند مواردی نظیر قدرت اثروغیره را نشان دهد.[۳۱] به طور کلی پذیرفته شده است که مقادیر MIC یک پارامتر خوب، برای توصیف عملکرد ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها و ضدعفونی کننده ها است، ولی این پارامتر برای ضدعفونی کننده ها به اندازه ی کافی دقیق نیست. در واقع، مقدار MIC می تواند به شدت تحت تاثیر زمان انکوباسیون باشد (بالای ۱۸ ساعت برای هوازی ها و ٤٨ ساعت در مورد بی هوازی ها) این مسئله منشا محدودیت های معنادار است، زیرا غلظت ماده ی ضد میکروبی می تواند در طی زمان انکوباسیون دچار تغییر شود. همچنین مدت زمان تماس بین باکتری و ماده ی ضدمیکروبی در این تست بسیار طولانی تر از شرایط بالینی است. MBC می تواند پارامتر بهتری برای ارزیابی تاثیر واقعی محلول ضدمیکروبی باشد. البته ارزیابی کینتیک اثر کشندگی معیار دقیق تری برای ارزیابی تاثیر محلول های ضد میکروبی می باشد.[۳۲] زیرا در لوله ها و پلیت های حاوی محیط کشت، ماده ی ضد میکروبی در تماس با میکروب می باشد، ولی در استفاده از مواد ضد میکروبی به صورت دهانشویه، معمولا بعد از چند ثانیه غرغره کردن، ماده از محیط دهان حذف می شود و عوامل موجود در دهان اثر آن را خنثی می کنند. در مطالعه ی حاضر با بررسی کینتیک مرگ، سعی بر این شد که مواد مورد آزمایش، در مدت زمانهای کوتاه مشابه آنچه در شرایط بالینی اتفاق می افتد در تماس با میکرو ارگانیسم ها قرار گیرند.

در این مطالعه محلول نانونقره و نیز کلرهگزیدین در زمان ۳۰ ثانیه به طور قابل توجهی باعث از بین رفتن هر دو باکتری شدند. به طور دقیق تر، در کمترین زمان مجاورت، ٦ سیکل لگاریتمی از سوش های مورد مطالعه از بین رفتند که این بیانگر اثر خوب و سریع محلول نانونقره و کلرهگزیدین می باشد.

در این مطالعه هم چنین اثر آنتی بیوفیلم نانو نقره و کلرهگزیدین بر روی دو باکتری مورد بررسی از طریق روش Tissue culture plate (TCP) آزمایش گردید که بر طبق مطالعات، این روش در مقایسه با سایر روشها، استاندارد طلایی ارزیابی تشکیل بیوفیلم می باشد.[۳۳و۳٤] نتایج نشان داد علی رغم اینکه نانوذرات نقره در غلظت های مورد بررسی کاهش بیشتری را در تشکیل بیوفیلم نسبت به کلرهگزیدین در برابر باکتری های S.m و A.a سبب می شوند اما این کاهش بیشتر از لحاظ آماری، برای هیچ کدام از باکتری ها معنادار نبود.

Besinis و همکاران[۳۵] در مطالعه ای که به بررسی مهار تشکیل بیوفیلم و خواص آنتی باکتریال ذرات نانوسیلور بر روی عاج دندانی پرداخته بودند، نشان دادند که تاثیر ذرات نانوسیلور بر مهار تشکیل بیوفیلم به مراتب بیشتر از کلرهگزیدین است. ولی در مطالعه ی ما این تفاوت معنی دار نبود که این اختلاف می تواند به علت نوع تست آزمایشگاهی انجام شده باشد. در مطالعه ما اثر محلول نانو نقره برروی جلوگیری از تشکیل بیوفیلم مستقیما بر روی باکتری با استفاده از روش TCP صورت گرفت ولی در مطالعه Besinis و همکاران[۲۵] رشد باکتری و زنده ماندن

www.SID.ir

Archive of SID

سلول ها با اندازه گیری کدورت، نسبت سلول های زنده و مرده و تولید لاکتات به صورت کمی اندازه گیری شده است.

همچنین Kalishwaralal و همکاران[۳٦] به بررسی مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با استفاده از متد Tissue culture plate توسط پارتیکل های نانونقره در بیماری کراتیت پرداخته بودند؛ نتایج آنها نشان داد نانونقره می تواند موجب مهار ۹۵ درصدی تشکیل بیوفیلم در کراتیت گردد.

نکته ای که باید به آن توجه داشت این است که مقادیر موثر نانونقره بر میکروارگانیسم های مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی بدست آمده است و ممکن است این غلظت در شرایط بالینی چنین اثری نداشته باشد. علت این تفاوت، محیط دهان و وجود عواملی است که در محیط آزمایشگاه وجود ندارد. در محیط دهان ماتریکس بین سلولی پلاک از تاثیر دهانشویه و سایر مواد ضدمیکروبی موضعی روی میکروارگانیسم های پلاک جلوگیری می کند.[۳۷] نقش بزاق از لحاظ pH دهان و رقیق کردن ماده نیز قابل ذکر است.حرارت دهان با درجه حرارت انکوباتور متفاوت می باشد، وجود خون و توان اکسیداسیون و احیای مختلف در نقاط مختلف دهان نیز می توانند روی نتایج اثر بگذارند.[۳۷] نتایج تمام مطالعاتی که در مورد اثر آنتی باکتریال نانوذرات نقره انجام شده است نشان می دهد که این ماده در غلظت های پایین سبب مهار رشد و مرگ میکروارگانیسم ها می شود.[۳۹و۳۸] ازآنجایی که سلولهای یوکاریت بسیار بزرگتر از پروکاریوت ها هستند و دارای زوائد ساختاری و فانکشنال پیچیده تری در مقایسه با سلول های پروکاریوت هستند، لذا برای ایجاد اثر سیتوتوکسیک در سلول های یوکاریوت غلظت بیشتری از یون نقره لازم است.[٤۰] بنابراین بعید به نظر می رسد که استفاده از نانوذرات نقره در غلظت های پایین که علیه میکروارگانیسم ها موثر می باشد، آثار سمی بر روی سلول های یوکاریوت داشته باشد. البته این موضوع نیاز به بررسی های بیشتری دارد. بایستی توجه شود که خصوصیات نانوذرات نقره، نظیر شکل و اندازه نه تنها بر روی خواص ضد میکروبی آن تاثیر دارند، بلکه در زمینه ی کاهش توکسیسیته ی بافتی و سمیت بر روی سلول های یوکاریوت نیز موثر است. خطرات احتمالی شامل تاثیر منفی بر سلامت انسان و نیز افزایش ورود آن به محیط است که می تواند منجر به پیدایش گونه های مقاوم باکتریای شود؛ همگی اینها از جمله عواملی هستند که می توانند موانعی بر سر راه گسترش روز افزون استفاده از نانوذرات نقره باشند.[٤۱] ولی با در نظر گرفتن کلیه مطالب بیان شده، مطالعات نشان می دهند که ذرات نانونقره، پتانسیل قابل توجهی برای تبدیل شدن به عنوان انتخاب اول مواد ضدمیکروبی را دارند.[٤۲]

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات ضدمیکروبی قوی و سریع بر علیه دو باکتری مهم پلاک دندانی یعنی استرپتوکوکوس موتانس و اگریگاتیباکتر اکتینومیست کومینس می باشد و هم چنین دارای پتانسیل بالایی برای مهار تشکیل بیوفیلم این باکتری هاست. این اثرات نانونقره مشابه اثر کلرهگزیدین می باشد. هرچند مطالعات بیشتری برای تعمیم این نتایج به محیط بالینی نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از دو پایان نامه با شماره ۷۵۲ و ۷٦۱ در دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد می باشد. از آقای دکتر سعید اشراقی و آقای دکتر رمضانی که در مراحل آزمایشگاهی پروژه یاری فراوان نمودند، تقدیر و تشکر می نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. JPeriodontol 1965;36(3):177-87.
2. Ghasemi M, Moghaddas O. The effect of different times application of chlorhexidine on the microbial plaque. J Dent 2010;11(3):240-6.
3. Saghazadeh M, Ashayeri N. The comparison between the effectiveness of six different tooth brushing methods on removing dental bacterial plaque. JDent Med 2004;17(2):26-38.
4. Addy M, MoranJM. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. Periodontol2000 1997;15:52-4.
5. Samaranayake L. Fungi of relevance to dentistry. Essent Microbiol Dent 2002; 5:142-7.
6. Addy M .Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials: a short review. J Clin Periodontol 1986;13(10):957-64.
7. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. New York: Elsevier Health Sciences; 2011.
8. Adams D, Addy M. Mouthrinses. Adv Dent Res 1994;8(2):291-301.
9. Balagopal S, Arjunkumar R. Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent. J Pharm Sci Res 2013;5(12):270.
10. Lang NP, Lindhe J.Clinical periodontology and implant dentistry.Oxford: Blackwell Munksgaard;2015.
11. Kokura S, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshikawa T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. Nanomedicine 2010;6(4):570-4.
12. Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson M, Lead JR, Tyler CR, Stone V. Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments. Environ Health 2009;8(Suppl 1):S2.
13. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. J Mater Sci Mater Med 2013;24(6):1465-71.
14. Espinosa-Cristóbal L,Martínez-Castanón GA, Martínez-Martínez RE, Loyola-Rodríguez JP, Patino-Marín N, Reyes-Macías JF, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans. Mater Lett 2009;63(29):2603-6.
15. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, Guillén Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine 2008;4(3):237-40.
16. Peng JM, Lin JC, Chen ZY, WeiMC, Fu YX, Lu SS, et al. Enhanced antimicrobial activities of silver-nanoparticle-decorated reduced graphene nanocomposites against oral pathogens. Materi Sci Eng C Mater Biol Appl 2017;71:10-6.
17. Sadeghi R, Olia P, Rezvani MB, Taleghani F, Sharif F. Comparison of the nanosilver and chlorhexidin antimicrobial effect on Streptococcus sangius and actinomicosis viscosus. J Islamic Dent Assoc 2010;23:225-31.
18. Azimi LH, Niakan M, Mohammad TG, Jafarian Z, Najafi F, Mostafavizadeh S, et al. Comparison of the antibacterial activity of various concentrations of Nigella Sativa and Nanosilver on the growth of S. sanguis and S. mutans. J Res Dent Sci 2013; 9(4):179-86.
19. Abadi MF, Mehrabian S, Asghari B, Namvar AE, Ezzatifar F, Lari AR. Silver nanoparticles as active ingredientused for alcohol-free mouthwash. GMS HygInfect Control 2013;8(1):Doc05.
20. Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans and Streptococcus sangius to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. DentRes J 2015;12(1):44-9.
21. Sadeghi R, Owlia P, Yaraee R, Sharif F, Taleghani F. An in vitro assessment of antimicrobial and cytotoxic effects of nanosilver. J Med Bacteriol 2015;1(3-4):44-52.
22. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by Streptococcus mutans in the presence of saliva. Infect Immun 2008;76(9):4259-68.
23. Brigido JA, da Silveira VR, Rego RO, Nogueira NA. Serotypes ofAggregatibacter actinomycetemcomitans in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. MedOral Patol Oral Cir Bucal 2014;19(2):e184-91.
24. Ramachandra SS. Low levels of caries in aggressive periodontitis: a literature review. Saudi Dent J 2014;26(2):47-9.
25. Jorgensen H. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Wayne, PA:National Committee for Clinical Laboratory Standards Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS M7-A3;1993.

www.SID.ir

Archive of SID

26. McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. JAm Med Assoc 1907;49(14):1176-8.
27. Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Methods 2003;54(2):269-76.
28. Saranyan R, Manovijay B, Babu GB, Nithya I, Anitha A. Biochemical identification of aggregatibacter actinomycetemcomitans in an indian sample with aggressive periodontitis. J Adv Microbiol 2017; 4:1-8.
29. Vargas-Reus MA, Memarzadeh K, Huang J, Ren GG, Allaker RP. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. Int J Antimicrob Agents 2012;40(2):135-9.
30. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005;16(10):2346-53.
31. Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, et al. Genome of the opportunistic pathogen Streptococcus sanguinis. J Bacteriol 2007;189(8):3166-75.
32. Ruiz L, Escribano C, Veiga-Crespo P, Villa TG, Vinuesa T. "In vitro" comparative experimental study of antimicrobial action of mouth washing products. BullGroupement IntRes Sci Stomatol Odontol 2007;48(1):32-8.
33. Deka N. Comparison of tissue culture plate method, tube method and congo red agar method for the detection of biofilm formation by coagulase negative staphylococcus isolated from non-clinical isolates. Int J Curr Microbiol Appl Sci 2014;3(10):810-5.
34. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol 2006;24(1):25-9.
35. Besinis A, De Peralta T, Handy RD. Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine. Nanotoxicology 2014;8(7):745-54.
36. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Colloids Surf B Biointerfaces 2010;79(2):340-4.
37. Lu L, Sun R, Chen R, Hui CK, Ho CM, Luk JM, et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. Antivir Ther 2008;13(2):253-62.
38. Lee H, YeoSY, Jeong SH. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics. J Mater Sci 2003;38(10):2199-204.
39. Dabbagh MA, Moghimipour E, Ameri A, Sayfoddin N. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of nanosilver containing hydrogels. Iran J Pharm Res 2010; 7(1):21-8.
40. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. Biomaterials 2004;25(18):4383-91.
41. Durán N, Marcato PD, Conti RD, Alves OL, Costa F, Brocchi M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J Brazil Chem Soc 2010;21(6):949-59.
42. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine 2016;12(3):789-99.

www.SID.ir