Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Inhibitory Effect of Acidulated Phosphate Fluoride and Sodium Fluoride Gels on Levels of Cariogenic Organisms in Oral Cavity Using Quantitative Real Time PCR

Haleh Hali[1],
Fatemeh Jahanimoghadam[2],
Mohammadreza Bazrafshani[3]

[1] Assistant Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received December 13, 2015 Accepted March 5, 2016)

Abstract

Background and purpose: Several factors are involved in caries prevention in children. One of the most effective factors is the appropriate use of fluoride. Fluoride induces its main effects in caries prevention through antibacterial effects and topical contact with enamel. In this study the inhibitory effects of sodium fluoride (NaF) and acidulated phosphate fluoride (APF) gels on cariogenic microorganisms concentrations (*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*) were compared using Quantitative Real-Time PCR.

Materials and methods: A single blind parallel clinical trial was performed in which plaque samples were investigated twice (before and after the use of fluoride). The plaque samples of 44 children were studied by quantitative Real Time PCR and the number of bacteria (*lactobacilli* and *Streptococcus mutans*) was counted in each sample. Then, APF gel (Fluoride 1.23% +0.98% phosphoric acid, pH 5.3) was randomly used for 22 children. All the teeth (primary and permanent) were covered with fluoride by applicator. For other children 2% NaF gel (neutral pH) were used. After the use of fluoride, the numbers of bacteria were measured again by quantitative real-time PCR. Finally, the variability of microorganisms before and after the intervention was compared. Mann-Whitney test was applied for data analysis using SPSS V.18.

Results: Significant reductions were observed in numbers of *streptococcus mutans* and *lactobacillus* after consumption of APF-gel ($P<0.05$).

Conclusion: The APF gel exhibited more caries-preventive effect compared to NaF gel and could be used to benefit children's oral health.

Keywords: acidulated phosphate fluoride, sodium fluoride, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, quantitative Real Time PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(134): 105-113 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۴ اسفند سال ۱۳۹۴ (۱۱۳-۱۰۵)

مقایسه تاثیر مهاری ژل APF و ژل سدیم فلوراید [NAF] بر روی غلظت میکروارگانیزم های پوسیدگی زا در محیط دهان با روش Quantitative Real Time PCR

هاله حالی[۱]
فاطمه جهانی مقدم[۲]
محمدرضا بذرافشانی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: با وجودی که عوامل متعددی در برنامه‌های پیشگیری از پوسیدگی در کودکان وجود دارند، شاید هیچ‌کدام از آن‌ها به اندازه کاربرد مناسب فلوراید درکاهش پوسیدگی مؤثر نباشند. اثرات اصلی پیشگیری ازپوسیدگی فلوراید به وسیله تماس موضعی با مینا و از طریق اعمال اثر آنتی‌باکتریال آن صورت می‌گیرد. هدف از این تحقیق، مقایسه تأثیر مهاری ژل NAF و APF بر روی غلظت میکروارگانیسم‌های پوسیدگی زا (استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل) با روش Quantitative Real-Time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت کارآزمایی بالینی کلاسیک یک سو کور می‌باشد و در هر نمونه دو اندازه‌گیری (قبل و بعد از مداخله) صورت گرفت، به این صورت که ابتدا ۴۴ نمونه پلاک از کودکان مورد ارزیابی اولیه باکتریایی با روش Quantitative Real Time PCR قرار گرفت و تعداد باکتری‌های لاکتوباسیل و استرپوکوک در هر نمونه به دست آمد. در مرحله دوم به‌طور تصادفی برای۲۲ نفر، ژل APF (۱/۲۳ درصد فلوراید + ۰/۹۸ درصد اسیدفسفریک) با اسیدیته ۳/۵ با استفاده از اپلیکاتور در تمام سطوح دندان های موجود در دهان (شیری و دائمی) مالیده شد. هم‌چنین، برای ۲۲ نفر باقیمانده از ژل ۲ درصد NAF با اسیدیته خنثی استفاده شد. بعد از انجام اعمال مربوط به تحقیق، اندازه‌گیری‌های تعداد باکتری‌ها، مجدداً توسط تکنیک ریل تایم کمی صورت پذیرفت. سپس میزان تغییر میکرواگانیسم‌های پوسیدگی زای پلاک، قبل و بعد از مداخله در دو گروه مقایسه شد. در این مطالعه از آزمون آماری Mann-Whitney استفاده شد.

یافته‌ها: رشد میکروارگانسیم‌های لاکتوباسیلوس و استرپتوکوک موتانس بعد از مصرف APF نسبت به NAF به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$).

استنتاج: از ژل APF با اطمینان بیش‌تری در پیشگیری از پوسیدگی دندانی در کودکان می‌توان بهره جست.

واژه های کلیدی: NAF، APF، استرپتوکوک موتانس، لاکتوباسیل، Quantitative Real Time PCR

مقدمه

پوسیدگی دندان بیماری است که با دکلسیفیکاسیون قسمت‌های غیر آلی دندان شروع می‌شود. از دست دادن محتوای معدنی با تخریب ماتریکس آلی دنبال می‌شود. این روند مخرب ناشی از متابولیسم کربوهیدرات‌ها به وسیله میکروارگانیزم‌های دهان می‌باشد(۱). در روند پوسیدگی، نه تنها باکتری‌ها باید قادر به پایداری در محیط اسیدی

مولف مسئول: هاله حالی– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده دندانپزشکی
E-mail: h.hali.md@gmail.com
۱. استادیار گروه کودکان دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار گروه کودکان دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۳. استادیار گروه ژنتیک دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۹/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۰/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

باشند، بلکه باید خود باعث تولید اسیدهای آلی نیز شوند که به این حالت، اسیدوژنیک می‌گویند. بنابراین، برای تکامل پوسیدگی، باکتری اسیدوژنیک (تولیدکننده اسید) باید وجود داشته باشد، هم‌چنین باید عاملی مانع از شسته شدن محیط ایجادکننده پوسیدگی گردد. پلاک دندانی هر دوی این عملکردها را به‌طور کامل داراست. پلاک دندانی، کمک به حفظ کلونی‌های باکتریایی محیط ژله مانندی از گلوکان می‌کند و نیز سبب ممانعت از شسته‌شدن، خنثی‌شدن یا تحت تاثیر قرار گرفتن عوامل آنتی‌میکروبیال بزاقی یا مصنوعی می‌شود. اگرچه وجود پلاک برای تولید اسید ضروری است، ولی تنها پلاک‌های دارای تعداد کافی از اجتماعات استرپتوکوک‌های گروه موتانس و لاکتوباسیل‌ها قادر به ایجاد افت کافی در PH برای ایجاد فرآیند معدنی‌زدایی در دندان‌ها می‌باشند(۳،۲). برخی از استرپتوکوک‌های ویریدانس مانند استرپتوکوک موتانس، نقش عمده‌ای در ایجاد پوسیدگی دندان با سنتز مقدار زیادی پلی ساکارید از قبیل دکستران یا لوان از ساکارز دارند(۴). ارزیابی‌های متعددی در مورد ارتباط بین تعداد استرپتوکوک موتانس و پوسیدگی دندانی وجود دارد(۶،۵). استرپتوکوک موتانس معمولاً به تعداد نسبتاً زیادی در پلاکی که بلافاصله بر روی سطح صاف ضایعات پوسیدگی قرار دارد، دیده می‌شود. شمارش تعداد استرپتوکوک موتانس از بزاق ۲۰۰ کودک نشان داد که ۹۳ درصد کودکان با پوسیدگی قابل کشف از نظر وجود استرپتوکوک موتانس مثبت بودند و این در حالی بود که کودکانی که آلوده نشده بودند، تقریباً عاری از پوسیدگی بودند(۷). در مطالعه Zhan-yong و همکاران (۲۰۱۲) نسبت Streptococcus.mutans به کل باکتری‌ها در افراد دارای پوسیدگی، بیش‌تر بود(۸). لاکتوباسیل‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی یا میکروآئروفیلیک، آلفاهمولیتیک و گاهی به شکل کوکوباسیل و مشابه با استرپتوکوک ویریدانس می‌باشند. این باکتری‌ها، فلور طبیعی واژن بوده و گاهی در عفونت‌های عمیق هم یافت می‌شوند(۴). لاکتوباسیل‌ها به مقدار کمی در شروع ضایعه پوسیدگی دندانی درگیر هستند، اما اعتقاد بر این است که در پیشرفت پوسیدگی نیز دارای نقش باشند(۹). مطالعه Byun و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دهنده تنوع گونه‌های لاکتوباسیل در پوسیدگی‌های پیشرفته دندانی و تکثیر گونه‌های اصلی و فیلوتایپ‌های مربوط به این جنس باکتری در محیط پوسیدگی می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیل‌ها در ارتباط با بیماری‌زایی و گسترش ضایعه پوسیده دارای نقش موثری می‌باشند(۱). با توجه به سیر پیشرونده پوسیدگی در کودکان، یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل، استفاده از فلورایدهای موضعی است. اثر ضد پوسیدگی فلوراید، به واسطه یک واکنش شیمیایی و تبادل یون فلوراید با خارجی ترین لایه مینای دندان می‌باشد(۱۰).

روش‌های متفاوتی برای شناسایی این باکتری‌ها در پلاک‌های دندانی اعم از روش‌های کشت، تست‌های بیوشیمیایی و روش‌های ایمونولوژیکی وجود دارند. اما، این تکنیک‌ها زمان بر بوده و حساسیت پایینی در تشخیص دارند، بنابراین در جایی که نیاز به تصمیم تشخیصی سریع می‌باشد، نامناسب می‌باشند(۸). یکی از پیشرفت‌های اخیر در روش PCR(polymerase chain reaction)، ابداع روش مبتنی بر فلورسانس یا همان Real time PCR است. از مزایای qPCR(quantitative PCR) حساسیت، دقت و سرعت آن در به دست آوردن نتایج می‌باشد. این مطالعه درصدد است که به طور اساسی به تاثیر مواد حاوی فلوراید بر روی پوسیدگی بپردازد و آن مقایسه اثر دو ژل APF (acidulated phosphate fluoride) و ژل سدیم فلوراید به صورت قبل و بعد از مداخله، بر روی غلظت عوامل مهم پوسیدگی زا یعنی استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل با روش qPCR می‌باشد.

مواد و روش ها

نحوه نمونه گیری مطالعه حاضر از نوع کارآزمایی بالینی کلاسیک (parallel clinical Trial) یک سو کور

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد و در هر نمونه، دو اندازه‌گیری (قبل و بعد از مداخله) صورت گرفت. با استفاده از روش مقایسه میانگین‌ها و با توجه به مطالعات مشابه و در نظر گرفتن الفا برابر ۵ درصد و بتا برابر ۱۰ درصد و حداقل تفاوت قابل ملاحظه (d) برابر انحراف معیار (SD)، حجم نمونه در هر گروه ۲۲ نفر محاسبه شد. نمونه‌های مورد بررسی، ۴۴ کودک با میانگین سنی بین ۱۲-۶ سال از کودکان نگهداری شده در یک مدرسه شبانه‌روزی بودند. والدین کودکان با امضا فرم رضایت‌نامه، آمادگی خود را جهت همکاری خود و کودکانشان اعلام داشتند. انتخاب کودکان از یک مرکز، جهت همسان‌سازی نمونه‌ها از نظر مشابه بودن نوع غذای مصرفی و در دسترس بودن یکسان وسایل رعایت بهداشت دهان بود. چنان چه کودکان در سه ماه قبل از انجام مطالعه، از آنتی‌بیوتیک، داروهای تغییر دهنده جریان و ترکیب بزاق، فلوراید و دهان شویه‌های ضدمیکروبی استفاده نموده بودند، از مطالعه حذف شدند. هم‌چنین فقدان بیماری سیستمیک نیز در انتخاب کودکان در نظر گرفته شد. در ابتدا برای ۴۴ کودک انتخاب شده، در یک روز، عمل پروفیلاکسی انجام شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت توصیه شد که کودکان رژیم غذایی یکسان و بدون انجام رعایت بهداشت داشته باشند. بعد از ۴۸ ساعت، از سطح باکال اولین مولرهای دائمی ماگزیلا و سطح لینگوال اولین مولرهای دائمی مندیبل، مقداری پلاک توسط قاشقک مخصوص برداشته شد. پس از برداشت پلاک، دندان‌های تمام کودکان پروفیلاکسی شدند. پس از تمیز شدن دندان‌ها، ایزولاسیون دندان ها توسط رول پنبه انجام شد. در مرحله دوم، به صورت تصادفی برای ۲۲ نفر ژل APF (۱/۲۳ درصد فلوراید + ۰/۹۸ درصد اسیدفسفریک) با اسیدیته ۳/۵ (کارخانه sultan) با استفاده از اپلیکاتور در تمام سطوح دندان‌های موجود در دهان (شیری و دائمی) مالیده شد و برای ۲۲ نفر باقیمانده، ژل ۲ درصد neutral NAF(natpio fluoride) (کارخانه sultan) استفاده شد. ژل توسط نخ دندان از تماس بین دندانی رد شد و اجازه داده شد که ۴ دقیقه در تماس با سطوح دندانی باقی بماند. بعد از انجام فلوراید تراپی، کودکان به مدت نیم ساعت از شستن دهان، خوردن و آشامیدن و هم‌چنین به مدت ۴۸ ساعت بعد از فلوراید تراپی، از مسواک زدن و رعایت بهداشت منع شدند و رژیم غذایی در این مدت برای تمام کودکان یکسان و مشابه رژیم غذایی مرحله اول بود. نمونه‌های پلاک همان روز جهت تکمیل مراحل بعدی به آزمایشگاه فرستاده شد. نمونه پلاک اول، نمونه پلاک کنترل بود. بعد از ۴۸ ساعت، نمونه‌برداری پلاک به روش قبل، از هر دو گروه انجام شد.

استخراج DNA و انجام Q-PCR

DNA ی باکتری‌ها در نمونه‌های پلاک و نمونه‌های باکتری‌های استاندارد با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن و طبق پروتکل کیت استخراج گردید. در این مطالعه، از نمونه‌های باکتری استاندارد استرپتوکوک موتانس (PTCC 1683) و لاکتوباسیلوس (PTCC 1332) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران استفاده گردید. DNA ژنومی خالص شده از این باکتری‌ها از رنج ۱۰ تا $۱۰^{۷}$ کپی در میکرولیتر به عنوان استاندارد برای تهیه منحنی استاندارد در واکنش Real time PCR استفاده گردید. واکنش q Real time PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری انجام شد. مخلوط واکنش شامل 1X SYBR GREEN، ۱۰۰ نانومول از هر پرایمر و ۲ میکرولیتر از نمونه‌های DNA استخراج شده از پلاک‌ها و نمونه‌های استاندارد می‌باشد. نمونه‌ها در دستگاه ریل تایم کربت ۶۰۰۰ (Corbett Rotor-Gene 6000) قرار داده شدند. شرایط PCR شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در مرحله اول، سپس ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه می‌باشد. برای تعیین اختصاصی بودن واکنش‌ها، آنالیز دمای ذوب نیز برای محصولات PCR صورت گرفت. برای هر نمونه پلاک، هم قبل از تیمار و

www.SID.ir

Archive of SID

هم بعد از تیمار، سه تکرار گذاشته شد و میانگین محاسبه شد. با استفاده از این روش، ضمن شناسایی و تعیین وجود هر یک از این باکتری‌ها در مخلوط DNA، می‌توان کمیت یا تعداد هر باکتری را در هر نمونه تعیین کرد. آنالیز آماری در این مطالعه با استفاده از روش‌های غیرپارامتری و آزمون آماری Mann-Whitney انجام شد، به طوری که تغییرات تعداد میکروب‌ها قبل و بعد از مداخله و در دو گروه با یکدیگر مقایسه شد. برای این تجزیه و تحلیل از نرم‌افزار آماری SPSS ver18 استفاده گردید.

یافته ها

همان‌طورکه گفته شد، در این بررسی اثر دو ژل APF و NAF بر روی تعداد میکروارگانیسم‌های لاکتوباسیل و استرپتوکوکوس موتانس سنجیده شد. همان‌طورکه در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، میانگین تعداد لاکتوباسیلوس بعد از استفاده از APF، کاهش یافته است که این تفاوت از لحاظ آماری بسیار معنی‌دار است (p =۰/۰۰۰۱). این کاهش در مورد NAF نیز دیده می‌شود، اما معنی‌دار نیست (p =۰/۶۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که لاکتوباسیلوس‌ها پس از استفاده از APF نسبت به استفاده از NAF، کاهش بسیار بیش‌تری داشته‌اند (۶۰ درصد در مقابل ۴۹درصد). هم‌چنین، میانگین تعداد استرپتوکوکوس موتانس بعد از مصرف هر دو محصول فلورایده کاهش یافته است (جدول شماره ۲). میانه رشد استرپتوکوکوس در ۵۰ درصد افراد قبل از مصرف APF، کم‌تر و مساوی با ۳۹۷۱ و بعد از مصرف کم‌تر و مساوی با ۲۰۱ می‌باشد و مقدار استرپتوکوکوس در ۵۰ درصد افراد قبل از مصرف NAF کم‌تر و مساوی ۵۷۳۷ و بعد از مصرف ۲۶۲۳ می‌باشد. یعنی هر دو محصول سبب کاهش تعداد باکتری استرپتوکوک موتانس شده‌اند، ولی APF سبب کاهش تعداد بیش‌تری از باکتری‌ها گردیده است و این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار شده است (p =۰/۰۰۶).

به طور کلی، آنالیز آماری نشان می‌دهد که مصرف APF، موجب اختلاف معنی‌داری در تعداد لاکتوباسیلوس (p =۰/۰۰۰۱) و استرپتوکوکوس موتانس (p =۰/۰۰۶) درقبل و بعد ازمصرف این ماده شده است. در صورتی‌که از لحاظ آماری، مصرف NAF اثر معنی‌داری بر تعداد لاکتوباسیلوس (p =۰/۶۳۸) و استرپتوکوکوس موتانس (p =۰/۴۰۸) در قبل و بعد از مصرف این ژل نداشته است.

جدول شماره ۱: تعداد لاکتوباسیلوس های جدا شده از پلاک دندان با استفاده از روش q-PCR در دو مرحله قبل و بعد از اعمال تیمار با دو ماده APF و NAF

APF	قبل از مصرف	بعد از مصرف	اختلاف
میانگین	۳۹۰۹۰۹	۱۵۷۶۷۴	۲۳۳۲۳۵
میانه	۲۰۱۳۲۷	۱۹۲۰۳	۱۵۳۸۶۲
انحراف معیار	۴۷۳۴۶۰	۲۸۴۰۸۵	۲۶۷۹۱۵
درصد کاهش	۶۰ درصد	Pvalue	*۰/۰۰۰۱
NAF	قبل از مصرف	بعد از مصرف	اختلاف
میانگین	۱۱۵۰۴۲	۱۰۷۳۵۲	۷۶۹۰
میانه	۵۴۴۲۸	۶۰۰۳۶	۱۹۵۸
انحراف معیار	۱۴۶۹۸۵	۱۱۱۸۵۳	۱۴۰۹۲۶
درصد کاهش	۴۹ درصد	Pvalue	۰/۶۳۸

*

هم‌چنین جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که میانگین تعداد لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس موتانس بعد از مصرف APF و NAF نسبت به قبل از مصرف کاهش یافته است. همان‌طور که دیده می‌شود، لاکتوباسیلوس به‌طور معنی‌داری نسبت به استرپتوکوکوس موتانس کاهش بیش‌تری را نشان داده است (p =۰/۰۰۱).

جدول شماره ۲: تعداد استرپتوکوک موتانت جدا شده از پلاک دندان بر حسب تعداد سلول با استفاده از روش q-PCR در دو مرحله قبل و بعد از اعمال تیمار با دو ماده APF و NAF

APF	قبل از مصرف	بعد از مصرف	اختلاف
میانگین	۴۴۰۴۶	۲۲۱۱۰	۲۱۹۳۶
میانه	۳۹۷۱	۲۰۱	۲۴۳۷
انحراف معیار	۱۲۳۲۹۴	۶۰۷۸۱	۹۶۳۱۱
درصد کاهش	۵۰ درصد	*Pvalue*	*۰/۰۰۶
NAF	قبل از مصرف	بعد از مصرف	اختلاف
میانگین	۳۷۹۰۷	۹۵۸۲	۲۸۳۲۵
میانه	۵۷۳۷	۲۶۲۳	۳۵۵
انحراف معیار	۱۳۳۴۴۴	۱۹۸۰۴	۱۳۴۱۲۸
درصد کاهش	۸ درصد	*Pvalue*	۰/۴۰۸

*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳: اختلاف تعداد لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس موتانس بر حسب تعداد سلول بعد از مصرف APF و NaF نسبت به قبل از مصرف

ارگانیسم	میانگین اختلاف	میانه اختلاف	انحراف معیار
لاکتوباسیلوس	۱۲۰۴۶۲ /۵۹۰۹	۳۲۶۶۵ /۵۰۰۰	۲۴۰۳۴۷/۸۳۲
استرپتوکوکوس موتانس	۲۵۱۳ /۱۵۹۱	۱۲۲۱/۵۰۰۰	۱۱۵۳۳ /۴۸۰
	Mann-Whitney Test	p =۰/۰۰۱	

هم‌چنین جدول شماره ۴ نشان می‌دهد که به‌طور کلی، تعداد میکروارگانسیم‌ها (استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیلوس) بعد از مصرف APF نسبت به NAF به طور معنی‌داری کاهش یافته است (p =۰/۰۰۱).

جدول شماره ۴: اختلاف تعداد میکروارگانیسم ها بر حسب تعداد سلول بر اساس نوع ژل فلورایده

ژل فلورایده	میانگین اختلاف	میانه اختلاف	انحراف معیار
APF	۱۲۷۵۸۵ /۳۴۰۹	۷۸۱۱/۵۰۰۰	۲۲۵۸۴۵ /۴۱۵
NAF	۱۸۰۰۷ /۴۰۹۱	۱۰۹۶/۰۰۰	۱۳۶۳۵۹ /۶۹۳
	Mann Whitney Test	p ۰/۰۰۱	

بحث

پوسیدگی دندانی یک بیماری چند فاکتوری است که در نتیجه دمینرالیزاسیون مینا (به علت عملکرد اسید حاصل از متابولیسم باکتری) ایجاد می‌شود. در مطالعاتی، باکتری‌های استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان عامل پوسیدگی شناخته شده‌اند و وجود هر کدام از آن‌ها در پوسیدگی‌ها با آنالیز PCR تایید شده است. در این زمینه، Becker و همکاران (۲۰۰۲) و Okada و همکاران (۲۰۰۲) با روش PCR، وجود استرپتوکوک موتانس را در پوسیدگی دهان تایید نموده‌اند(۱۲،۱۱). هم‌چنین، لاکتوباسیلوس‌ها نیز به عنوان عامل ایجادکننده پوسیدگی، هم در پوسیدگی‌های سطحی و هم در پوسیدگی‌های عمیق دندانی، گزارش شده‌اند(۱۳). تکنیک‌های مولکولی دارای این مزیت می‌باشند که میانگین قابل اعتمادتری از تعداد باکتری‌ها را فراهم می‌آورند. روش‌های کشت برای شمارش تعداد باکتری‌ها دارای حساسیت کافی نیست، چون باکتری‌ها تنها در شرایطی کشت می‌شوند که نیازهای فیزیولوژیکی و متابولیکی آن‌ها در شرایط *In vitro* کاملاً تامین شده باشد. به عنوان مثال باکتری مثل *S. mutans* بر روی یکی از چندین محیط انتخابی رشد می‌کند(۱۴) که ممکن است این محیط اثر بازدارندگی بر روی رشد باکتری داشته باشد. هم‌چنین، این تکنیک زمان بر است و در مکان‌هایی که جامعه میکروبی، متشکل از کمپلکس پیچیده‌ای از باکتری‌هاست (مانند زیستگاه‌های میکروبی در حفره دهانی)، نتایج شمارش باکتری‌ها با روش‌های معمول کشت ممکن است نتایج نادرستی را تولید نماید(۱۵). شمارش سریع باکتری‌ها با انواع روش‌های مولکولی امکانپذیر است. اغلب روش‌ها از چندین جفت پرایمر برای تشخیص باکتری مورد نظر استفاده می‌نمایند یا مانند روش competitive PCR، روشی پرکار و نیازمند به استفاده از چندین واکنش برای هر نمونه می‌باشند(۱۶). اما روش Real time با آزاد کردن رنگ فلورسانس در طول هر مرحله ازتکثیرPCR، باعث شناسایی سریع و کمیت سنجی DNA بدون نیاز به انجام مراحل post-PCR مانند الکتروفورز و هیبریداسیون رادیواکتیو می‌باشد(۱۵).

Nadkarni و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که تخمین تعداد باکتری‌های بی‌هوازی در پوسیدگی دندانی با روش ریل تایم کمی، ۶۰ برابر بیش‌تر از روش مرسوم کشت شده است(۱۵). هم‌چنین، در مطالعه Childers و همکاران (۲۰۱۱)، میانگین تعداد کپی باکتری‌ها در روش qPCR، بیش تر از روش CFU شده است ($۱/۳ * ۱۰^{۶}$ در مقابل $۱/۵ * ۱۰^{۵}$ به ترتیب)(۱۷). در مطالعه Elizabeth و همکاران (۲۰۰۲)، تعداد بی‌هوازی‌ها با روش qPCR ۴۱ برابر بیش‌تر از روش colony contig در پوسیدگی دندانی گزارش شده است(۱۸)، که این امر اهمیت تکنیک ریل تایم را برای تخمین دقیق تعداد باکتری‌ها بیان می‌دارد. Hata و همکاران (۲۰۰۶) و choi و همکاران (۲۰۰۹) از qPCR برای تعیین دقیق تعداد S. mutans از نمونه‌های پلاک دندان بچه ها استفاده نمودند(۲۰،۱۹). پیشگیری از پوسیدگی دندانی در کودکان، یکی از اهداف شاخص دندانپزشکی اطفال محسوب می‌گردد. با وجود

www.SID.ir

Archive of SID

این که، عوامل متعددی در برنامه‌های پیشگیری از پوسیدگی در کودکان وجود دارند، شاید هیچ‌کدام از آن‌ها به اندازه کاربرد مناسب فلوراید در کاهش پوسیدگی مؤثر و مهم نباشند. محصولات متعددی از فلوراید به صورت دهان‌شویه‌ها، ژل‌ها، کف‌ها، محلول‌ها، خمیر دندان‌ها و وارنیش‌ها در دسترس اند. استفاده از محصولات فلورایده اثر مثبتی در پیشگیری از پوسیدگی دارد. درمان موضعی فلوراید (ژل، دهان شویه، وارنیش) همراه با خمیر دندان فلورایده، درمانی مقرون به صرفه است. مکانیسم عملکرد فلوراید به الکترونگاتیوی بالا و تمایل اتصال به کلسیم مربوط است. نفوذ فلوراید به ساختار دندان، باعث ایجاد کریستال کلسیم مقاوم به اسید می‌شود(۲۱).

نتایج این مطالعه نشان داد که ژل APF، تعداد لاکتوباسیل بیش‌تری را نسبت به ژل NAF کاهش داده است و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بوده است ($p<۰/۰۰۵$). ژل APF، ویسکوزیتی بیش‌تری دارد و به راحتی شسته[1] نمی شود. همان‌طور که در مطالعه Gao و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی میزان آزاد شدن فلوراید سمان‌های گلاس آینومر بعد از کاربرد ژل APF، به این نتیجه رسیده‌اند که ژل APF، ویسکوزیتی بالایی دارد و حتی با آب غیریونیزه به سختی شسته می‌شود(۲۲). دلیل دیگر آن که محتوای فلوراید ژل APF (۱/۲۳ درصد) نسبت به ژل NAF (۰/۹ درصد) بیش‌تر است. هم‌چنین، با اسیدی کردن محلول فلوراید، افزایش جذب فلوراید در مینا و افزایش اثر باکتریسیدال فلوراید را خواهیم داشت. پدیده آزادسازی فلوراید، تقابل پیچیده‌ای از چندین فاکتور است. آزادسازی فلوراید بعد از کاربرد موضعی فلوراید به PH، میزان غلظت، مدت کاربرد وتعداد دفعات استفاده بستگی دارد(۲۳). Delbem و همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند که فرم اسیدی ژل فلوراید، جذب فلوراید و مقاومت به پوسیدگی را افزایش می‌دهد(۲۴). چون ویژگی‌های ساختاری و سوخت و سازی (متابولیکی) هر ریزجاندار با ریزجاندار دیگر متفاوت است، بنابراین محصولات فلورایده بر استرپتوکوک موتانس و لاکتوباسیل اثر متفاوتی نشان داده اند(۲۵). از طرف دیگر، در این مطالعه، کاربرد ژل APF باعث کاهش تعداد استرپتوکوک موتانس بیش‌تری نسبت به NAF شده است. مطالعه Svanberg و همکاران نشان داد که در غلظت‌های بالای فلوراید موضعی مصرفی (۱۲۰۰۰PPm)، یون فلوراید مستقیماً برای برخی باکتری‌ها از جمله استرپتوکوک‌های گروه موتانس حالت توکسیک دارد. توقف رشد استرپتوکوک‌های گروه موتانس به دنبال یک بار مصرف موضعی فلوراید، ممکن است هفته‌ها تداوم یابد(۲۶). Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۷ ارتباط باکتری استرپتوکوک موتانس را با پوسیدگی‌های دندانی توسط real-time PCR بررسی کردند و این تست را در مقایسه با روش‌های معمول کشت باکتری، روشی دقیق‌تر و حساس‌تر دانستند(۲۷). Caufield و Wannemuehler (۱۹۸۴) نشان دادند که کاربرد روزانه ژل APF با PH:3.2، کاهش عمده باکتری استرپتوکوک موتانس را بعد از ۶-۱۲ هفته از درمان نشان می‌دهد(۲۸). اثر ضد میکروبی فلوراید بر روی فاکتور ویرولانس و ترکیب بیوفیلم دندانی مانند کاهش تشکیل اسید، فعالیت گلیکوزیل ترانسفراز و پتانسیل اسیدوژنیک استرپتوکوک موتانس به اثبات رسیده است. علاوه بر نقش فلوراید در فرآیند رمینرالیزاسیون دندانی، فلوراید می‌تواند کلونیزاسیون میکروبی را با افزایش توانایی آنتی‌کسیدان بزاق، کنترل کند. کاربرد فلوراید می‌تواند یون آهن (redox-active iron)، در محیط دهان را غیرفعال کرده و دسترسی این عامل ضروری برای رشد باکتری را کاهش دهد(۲۱). بنابراین در کلینیک هم باید به این نکته توجه شود که در شرایط مشابه، استفاده از ژل APF نسبت به ژل NAF، درکاهش تعداد باکتری‌های پوسیدگی زا موثرتر است. لذا ژل APF با اسیدیته ۳/۵ در مقایسه با ژل NAF خنثی موثرتر است و می‌توان با اسیدی کردن ژل NAF، اثر باکتریسیدال فلوراید را افزایش داد(۲۸).

1. washout

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

ایـن مطالعـه از پشـتیبانی مرکـز ژنتیـک، دکتـر بذرافشانی برخوردار بوده است که جا دارد بدین وسیله مراتـب تشـکر و قـدردانی از زحمـات ایشـان بـه جـا آورده شود.

References

1. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, and Hunter N. Quantitative Analysis of Diverse Lactobacillus Species Pressent in Advanced Dental Caries. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3128-3136.
2. Loeshe WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of streptococcus mutans with human dental decay. Infect Immun 1975; 11(6): 1252-1260.
3. Syed SA, Loesche WJ, Pape HL Jr, Grenier E. Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque. Infect Immun 1975; 11(4): 727-731.
4. Brooks GF, Morse SA, Brooks G, Butel JS. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology, 22nd ed. New York: Appleton & Lange; 2001.
5. Twetman S, Frostner N. Salivary mutans streptococci and caries prevalence in 8-year-old Swedish school children. Swed Dent J 1991; 15(3): 145-151.
6. Bratthall D, Hansel Petersson G. Cariogram--a multifactorial risk assessment model for amultifactorial disease. Community Dent Oral Epidemiol 2005; 33(4): 256–264
7. Edelstein B, Tinanoff N. Screening preschool children for dental caries using a microbial test. Pediatric Dent 1989; 11(2): 129-132.
8. Wang ZY1, Wang JQ, Zhou Y, Zhao D, Xiao B. Quantitative detection of Streptococcus mutans and bacteria of dental caries and no caries groups in permanent teeth from a north China population. Chin Med J 2012; 125(21): 3880-3884.
9. Pinkham JR, Casamassimo PS. Pediatric dentistry: infancy through adolescence, 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999.
10. Haris NO, Garcia-Godoy F. Primary Preventive Dentistry. 6th ed. New Jersey: Julie Levin Alexander; 2004.
11. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbial 2002; 40(3): 1001-1009.
12. Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K, et al. PCR detection of Streptococcus mutans and S.sobrinus in dental plaque samples from Japanese pre-school children. J Med Microbial 2002; 51(5): 443-447.
13. Hahn CL, Falker WA, Minah GE. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. Arch Oral Biol 1991; 36(2): 147-153.
14. Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. Comparison of five selective media for the growth and enumeration of Streptococcus mutans. Aust Dent J 2002; 47(1): 21-26.
15. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 2002; 148(Pt 1): 257-266.
16. Rupf S, Merte K, Eschrich K. Quantication bacteria in oral samples by competitive polymerase chain reaction. J Dent Res 1999; 78(4): 850-856.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Childers NK, Osgood RC, Hsu KL, Manmontri C, Momeni SS, Mahtani HK, et al. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for Enumeration of Streptococcus mutans from Oral Samples. Eur J Oral Sci 2011; 119(6): 447-454.
18. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. J Clin Microbiol 2002; 40(5): 1698-1704.
19. Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H. Quantitative detection of Streptococcus mutans in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. Lett Appl Microbiol 2006; 42(2): 127-131.
20. Choi EJ, Lee SH, Kim YJ. Quantitative real-time polymerase chain reaction for Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in dental plaque samples and its association with early childhood caries. Int J Paediatr Dent 2009; 19(2): 141-147.
21. Leite MF, Ferreira NF, Shitsuka CD, Lima AM, Masuyama MM, SantAnna GR, et al. Effect of topical application of fluoride gel NaF 2% on enzymatic and non-enzymatic antioxidant parameters of saliva. Arch Oral Biol 2012; 57(6): 630-635.
22. Gao W, Smales RJ, Gale MS. Fluoride release/uptake from newer glass-ionomer cements used with the ART approach. Am J Dent 2000; 13(4): 201-204.
23. Shashikiran ND, Subba Reddy VV, Patil R. Evaluation of fluoride release from teeth after topical application of NaF, SnF2 and APF and antimicrobial activity on mutans streptococci. J Clin Pediatr Dent 2006; 30(3): 239-245.
24. Delbam AC, Cury JA. Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. Am J Dent 2002; 15(3): 169-172.
25. Mortazavi M, Kohanteb J, Jahanimoghaddam F. Inhibitory effects of NaF-varnish and APF-gel on cariogenic bacteria: an in vitro study. J of Dentistry Shiraz University of Medical Sciences 2007; 8(15): 64-73 (Persian).
26. Svanberg M, Westegren G. Effect of SnF2, administered as mouthrinses or topically applied, on Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis and lactobacilli in dental plaque and saliva. Scand J Dent Res 1983; 91(2): 123-129.
27. Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. Development of species-specific primers for detection of streptococcus mutans in mixed bacterial samples. FEMS Microbial Lett 2007; 272(2): 154-156.
28. Caufield PW, Wannemuehler Y. PH-dependent bactericidal effects of acidulated fluoride gels on performed plaque aggregates of streptococcus mutans 6715. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26(6): 807-810.

www.SID.ir