2nd National Conference on Interdisciplinary Research in Management & Medical Science
16th September 2021-Tehran
دومین همایش ملی تحقیقات میان رشته ای در مدیریت و علوم پزشکی
۲۵ شهریور ۱۴۰۰ محل برگزاری: تهران

بررسی ژن‌های مؤثرGtfB و GtfC باکتری استرپتوکوکوس‌موتانس در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی

فاطمه قره خانی[۱]، امیرحسین مومن[۲]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران (مسئول مکاتبات)
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پایه، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران
۳- گروه دانشگاه علمی کاربردی شیکوتیمی **(U Q A C)** کانادا

چکیده

1

زمینه و اهداف: هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های مؤثرgtfB و gtfC باکتری استرپتوکوکوس‌موتانس در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی می‌باشد.

مواد وروش کار: این پژوهش از نوع مطالعه‌ی تجربی- آزمایشگاهی[1]می‌باشد. آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نسخه ۲۴ نرم افزار **SPSS** انجام گرفت.

یافته ها: بر اساس نتیجه آزمایش **PCR** جهت شناسایی و تعیین ژن **gtfB/C** مشخص گردید که از ۴۶ ایزوله مورد مطالعه تنها ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن **gtfB** و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن **gtfC** بودند. شکل (۳) نتیجه آزمون **PCR** نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن‌های **gtfB/C** را نشان می‌دهد. طول قطعه **DNA** تکثیر شده برای ژن **gtfB**، **bp** ۵۱۷ و برای ژن **gtfC**، **bp** ۲۰۶ بود.

نتیجه گیری: *استرپتوکوکوس موتانس* با تخمیر مواد قندی تولید مقدار زیادی اسید می‌کند که باعث حل شدن مواد معدنی سطح مینای دندان و ایجاد پلاک‌های دندانی شده و در نهایت پوسیدگی دندانی حاصل می‌شود.

واژگان کلیدی : **PCR**، بیوفیلم، **gtfC**، ژن **gtfB**استرپتوکوکوس موتانس، ژن

[1] Exprimental

www.SID.ir

مقدمه

حفره دهان فضایی است غیر منظم و تا حدودی بیضی شکل که اولین توقفگاه مواد غذایی در بدن به شمار می‌رود و از اجزاء مختلفی تشکیل شده است. پس از جویدن غذا مقداری از آن در دهان و بین دندان‌ها و حد فاصل میان دندان‌ها و لثه قرار می‌گیرد. از آنجا که این مواد غذایی مورد استفاده فلور نرمال دهان قرار می‌گیرد باعث رشد میکروارگانیسمی دهان و تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی بر روی سطح و ریشه دندان‌ها می‌شود و در نهایت پوسیدگی دندان‌ها، بیماری پریودنتال را ایجاد می‌نماید (سالاری، ۱۳۸۰؛ جوناید[1] و همکاران، ۲۰۱۳).

فلور دهان شامل گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها بوده و در بر گیرنده باکتری‌ها، قارچ‌ها، مایکوپلاسماها، تک یاخته‌ها و احتمالاً فلور ویروسی می‌باشد. از این میان باکتری‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها از غالبیت نسبی برخوردار بوده و در حدود ۳۵۰ گونه مختلف قابل کشت و به نسبت بیشتری از فلور غیر قابل کشت که اخیراً با روش‌های مولکولی تشخیص داده شده‌اند، در این گروه قرار می‌گیرند. کوکسی‌های گرم مثبت شامل جنس استرپتوکوکوس‌های هوازی شامل گروه‌های موتانس، سالیواریوس، آنژینوسوس، میتیس می‌باشد. استرپتوکوکوس‌های بی هوازی شامل جنس‌های پپتواسترپتوکوکوس و استوماتوکوکوس می‌باشد (سالاری، ۱۳۸۰؛ بونه[2] و همکاران، ۲۰۰۵).

میکروارگانیسم‌ها در تشکیل پلاک دندانی یک شرط لازم برای گسترش پوسیدگی‌های دندانی هستند و شواهدی که نشان دهنده نقش استرپتوکوک موتانس در پوسیدگی‌های دندانی باشد شامل موارد زیر است:

۱) رابطه مستقیم بین تعداد استرپتوکوک‌های موتانس در بزاق و پلاک با شیوع پوسیدگی‌ها. ۲) رابطه مثبت بین گسترش ضایعات پوسیدگی و شمار استرپتوکوک‌های موتانس. ۳) تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی از ساکاروز (کمک به اتصال میکروارگانیسم‌های پلاک به همدیگر و به سطح دندان) (کوو[3] و همکاران، ۲۰۰۹؛ سلطان دلال[4] و همکاران، ۲۰۱۳).

پلاک دندانی یک رسوب چسبنده میکروبی است که بر روی سطوح نسج سخت در دهان تشکیل می‌شود و شامل باکتری‌های زنده، مرده، باکتری‌های در حال مردن و محصولات آن‌ها به همراه ترکیبات میزبان که اساساً مشتق شده از بزاق میزبان است، می‌باشد. میکروارگانیسم‌های پلاک دندانی با یک ماتریکس آلی احاطه می‌شوند که حدود ۳۰ درصد از حجم پلاک را شامل می‌شوند. ماتریکس از محصولات میزبان و اجزاء پلاک مشتق می‌شود. در محل لثه پروتئین‌های اگزودای شیاری جزو ترکیبات پلاک می‌شوند. این ماتریکس مانند سیمانی که باعث اتصال میکروارگانیسم به یکدیگر و نیز به سطوح مختلف می‌شود. ترکیبات میکروبی پلاک دندانی تنوع وسیعی بین افراد دارد. در برخی مردم پلاک دندانی سریع تشکیل می‌شود و در برخی آرام (هریس[5] و همکاران، ۲۰۰۴).

[1] Junaid
[2] Boone
[3] Koo
[4] Soltan Dallal
[5] Harris

www.SID.ir

قابلیت تشکیل بیوفیلم از مشخصه اصلی استرپتوکوکوس‌های موتانس به عنوان عامل اصلی عفونت‌های دهان و دندان نسبت به استرپتوکوکوس‌های ویریدانس است. این باکتری از نظر ظاهری، کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی و بی‌هوازی اختیاری است و جز فلور نرمال دهان محسوب می‌شود. استرپتوکوک موتانس با تخمیر سوکروز و تولید اسیدلاکتیک موجب تخریب مینای دندان می-شوند. همچنین این باکتری از سوکروز برای ساخت پلاک دندانی استفاده می‌کند. پلاک دندانی از دکستران که نوعی پلی‌ساکارید است، ساخته می‌شود (مارش[1] ۲۰۰۵).

عوامل محیطی و

فردی مانند رژیم غذایی، قرارگیری در معرض فلوراید، بهداشت دهان، جریان بزاق و عوامل ایمنی می‌توانند بر روی توزیع میکروفلور دهانی و ایجاد پوسیدگی دندانی تأثیر بگذارند (باتونی و همکاران[2] ۲۰۰۱). لذا هدف این مطالعه بررسی ژن‌های باکتری استرپتوکوکوس موتانس مؤثر در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی می‌باشد

زمینه و اهداف

هدف از این مطالعه بررسی ژن‌های مؤثرgtfB و gtfC باکتری استرپتوکوکوس‌موتانس در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی می-باشد. در این مطالعه تجربی سوآپ نمونه‌های پلاک دندانی افرادی که طی مدت ۳ ماه به کلینیک دندانپزشکی پاستور همدان مراجعه نمودند، جمع آوری شد. برای جداسازی استرپتوکوکوس موتانس، از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت باکتری‌های گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881614) صورت گرفت. جهت بررسی محصول PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱درصد منتقل شد. نتایج نشان داد از ۴۶ نمونه مورد مطالعه ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن gtfB و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن gtfC بودند. میزان جذب نوری بیوفیلم تولیدی توسط نمونه‌ها با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین میزان جذب ۱/۴۳ می‌باشد. در این مطالعه بیشترین میزان رشد باکتری استرپتوکوک موتانس جداشده از پلاک دندان در غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر ساکارز و pH= ۴/۵ حاصل شد.

روش‌شناسی تحقیق

این پژوهش از نوع مطالعه‌ی تجربی- آزمایشگاهی[3]می‌باشد. آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نسخه ۲۴ نرم افزار **SPSS** انجام گرفت.

در جدول (۱) مواد مورد استفاده و تجهیزات مورد نیاز جهت بررسی ژن‌های مؤثر **gtfB** و **gtfC** باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی ذکر شده است.

[1] Marsh
[2] Batoni
[3] Exprimental

www.SID.ir

جدول (۱): تجهیزات و وسایل مورد نیاز

ردیف	تجهیزات مورد نیاز	ردیف	تجهیزات مورد نیاز
۱	چسب (**Pars center-Iran**)	۱۵	بشر(**Pars center-Iran**)
۲	پلیت(**Pars center-Iran**)	۱۶	ژل داک (**NANOLYTIC-Germany**)
۳	میکروتیوپ(**Pars center-Iran**)	۱۷	ترازوی دیجیتال **CT100C** (**Citizen**)
۴	ارلن(**Pars center-Iran**)	۱۸	ورتکس (**KiaGen**)
۵	کیت رنگ آمیزی گرم(**Pars center-Iran**)	۱۹	سمپلر (**Eppendorf, Germany**)
۶	چراغ الکلی(**Pars center-Iran**)	۲۰	هود لامینار(**Pase Azma-Iran**)
۷	لام نئو بار(**Pars center-Iran**) لامل(**Pars center-Iran**)	۲۱	انکوباتور (**FSA-Iran Fanavaran**)(**Sahand Azar**)
۸	معرف تست کاتالاز- معرف تست اکسیداز	۲۲	اسپکتروفتومتر
۹	الکل (**Pars center-Iran**)	۲۳	سانتریفوژ (**WiseSpin**)
۱۰	فالکون(**Pars center-Iran**)	۲۴	میکروسکوپ نوری(**Pas Azma-Iran**)
۱۱	فیلترسر سرنگی (**Biofil-Usa**)	۲۵	اتوکلاو(**Pas Azma-Iran**)
۱۲	روغن ایمرسیون(**Merck-Germany**)	۲۶	ترموسایکلر (**BIONEER XP cycler-Korea**)
۱۳	آنس(**Merck-Germany**)	۲۷	محیطکشت بلادآگار
۱۴	آب مقطر(**Pars center-Iran**)	۲۸	کیت استخراج **DNA** (سیناژن)

در این مطالعه سوآپ نمونه‌های پلاک دندانی افرادی که طی مدت ۳ ماه به کلینیک دندان‌پزشکی سیب (پاستور شهر همدان) مراجعه نمودند، جمع آوری شد. سپس، سوآپ‌ها در محیط نگهدارنده‌ی تایوگلیکولات (شرکت مرک آلمان) قرار گرفت و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. برای جداسازی *استرپتوکوکوس موتانس*، از محیط کشت بلاد آگار استفاده شد و نمونه‌ها بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد (شکل ۱).

بلاد آگار محیط کشت عمومی است که به منظور تکثیر و جداسازی باکتری‌های بیماری‌زا بخصوص باکتری‌هایی که برای رشد به مواد مغذی نیاز دارند، بکار می‌رود. این محیط از یک محیط پایه مانند تریپتون که منشاء پروتئینی دارد، کلرید سدیم آگار و ۵ درصد خون تشکیل شده است. بعلاوه در این محیط وجود همولیزین در باکتری‌ها را نیز می‌توان کاوش کرد**.** جهت مطالعه درست واکنش همولیتیک بر روی آگار خون‌دار، بایستی پلیت را در مقابل نور گرفته و مشاهده نمود. اگر از لوپ برای انجام کشت خطی بر روی بلاد آگار استفاده می‌شود باید آن را در آگار فرو برده، تا ارگانیسم بتواند در عمق محیط که اکسیژن کمتری دارد رشد کند. تولید همولیزین‌های حساس به اکسیژن در برخی از ارگانیسم‌ها بدین وسیله تشدید می‌گردد. در روش دیگر، می‌توان پلیت‌ها را جهت مشاهده واکنش همولیزین حساس به اکسیژن به طریق بی‌هوازی نیز گرماگذاری کرد (ایراجیان و همکاران، ۱۳۹۱).

برای ساخت محیط بلاد آگار (با مارک تجاری شرکت مرک کشور آلمان با کد تجاری ۳۲۶۲۸۶۱۴۹۱,۱۰۸۸۶,۰۵۰۰ **VM**) ابتدا مطابق دستورالعمل روی قوطی محیط کشت مقدار ۳۴ گرم برای یک لیتر از پودر محیط کشت برداشته با ترازوی دیجیتالی

www.SID.ir

آزمایشگاه وزن شد. سپس با مقدار متناسب از آب مقطر مخلوط کرده سپس جهت حل کردن پودر محیط کشت به داخل آب مقطر از حرارت و شعله مناسب و ملایم استفاده گردید. سپس محیط کشت اتوکلاو شد و جهت استفاده از محیط بعد از سرد شدن تا دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد آن را در شرایط استریل در زیر هود و کنار شعله به پلیت‌های ۱۰ سانتی متری منتقل نموده به صورتی که محیط دو، سوم از فضای پلیت را پر کند (شکل ۱).

شکل (۱): محیط بلاد آگار

پس از پخش محیط در داخل پلیت‌ها چنانچه در سطح آن‌ها حباب‌های هوا تشکیل شد، با استفاده از شعله، حباب‌ها از بین برده می‌شود. پس از آماده و منجمدشدن محیط‌های ساخته شده، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. رشد باکتری بر روی این محیط‌های کنترل، نمایان‌گر آلوده بودن محیط‌ها است. بنابراین از این محیط‌های آلوده نباید استفاده کرد. محیط بلاد آگار در داخل یخچال به مدت یک هفته پایدار است و چنان‌چه به‌نحوی از تبخیر آب آن جلوگیری شود، پایداری آن بیشتر می‌شود.

شکل (۲): رشد باکتری *استرپتوکوک موتانس* در محیط بلادآگار

به منظور تایید کلنی‌های مشکوک به *استرپتوکوکوس موتانس*، از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام میکروسکوپی تهیه و رنگ آمیزی گرم انجام شد. با مشاهده‌ی کوکسی‌های گرم مثبت، آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و

www.SID.ir

تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، هالوز، لاکتوز و مانیتول بر روی سویه‌های جداشده انجام و باکتری تعیین هویت شد (فاکلام[1] ۲۰۰۲؛ نوواک[2] و همکاران، ۱۹۹۴).

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم کلنی‌های باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* جداشده از پلاک‌های دندانی بیماران از پلیت ۹۶ خانه پلی‌استیرن استفاده شد، ابتدا باکتری‌ها را طبق استاندارد نیم مک فارلندتهیه نموده، سپس از محیط **BHI broth**[3] به همراه ساکاروز ۲ درصد و باکتری به چاهک‌ها تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. برای کنترل منفی از محیط‌های تازه و برای کنترل مثبت از سویه *استرپتوک موتانس* **PTCC35688** بیوفیلم مثبت استفاده شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، جهت خارج ساختن سلول‌های منفرد همه‌ی چاهک‌ها به آرامی تخلیه و جهت تثبیت بیوفیلم باکتری، متانول خالص به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به مدت ۱۰ دقیقه به چاهک‌ها اضافه شده و در دمای اتاق قرارگرفت. بعد از تخلیه، رنگ کریستال ویوله ۱ درصد **w/v** افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت این رنگ و دمای اتاق قرار گرفت. بعد از تخلیه رنگ و شستشو با آب مقطر، اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد حجمی را به آن اضافه نموده و جذب همه‌ی چاهک‌ها با دستگاه االایزاریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر، قرائت شد (شکل ۳).

یافته ها

ادبیات پژوهش استرپتوکوکوس‌موتانس سه نوع گلوکوزیل ترانسفراز[4](**GTF-I**، **GTF-SI**، **GTF-S**) تولید می‌کند که ژن گلوکوزیل ترانسفراز (**gtf-B**) توسط **GTF-I** کد می‌شود در مراحل ابتدایی سنتز گلوکان از ساکارز دخالت دارد و غیرقابل حل در آب است. این ژن از عوامل مهم حدت این باکتری می‌باشد (یوشین[5] و همکاران، ۲۰۰۲؛ یانو[6] و همکاران، ۲۰۰۲). ژن‌های کد **GtfB** و **GtfC** نزدیک به یکدیگر قرار دارند، یک ترکیب اسید آمینه بسیار مشابه دارند (۹۵ درصد همولوژی)، و در معرض فرآیندهای نظارتی یکسان قراردارند. این ژن‌ها در پاسخ به اسیدی شدن محیط و یا در شرایط حضور بیش از حد گلوکز یا سوکروز در محیط بیان می‌شوند. عوامل بسیاری علاوه بر بیان فیزیولوژیکی این ژن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. یکی از آن‌ها کاتابولیسم و عواملی مانند پروتئین **RegM**، که یک تنظیم کننده مهاری استرپتوکوک موتانس است. **RegM** ، پروتئین تنظیم کاتابولیسم در استرپتوکوکوس و باکتری استافیلوکوک، و همچنین به عنوان پروتئین کنترل کاتابولیت **A** (**CCPA**) شناخته شده است. عملکرد نظارتی آن بر اساس مهار ژن‌های دخیل در استفاده از منابع کربن جایگزینی متناوب و فعال شدن بیان ژن که در از بین بردن

[1] Facklam
[2] Novak
[3] Brain Heart Infusion broth
[4] Glucosyltransferase
[5] Yoshida
[6] Yano

www.SID.ir

محصولات کربن بیش از حد از سلول نقش داشته است، می‌باشد. غیر فعال شدن **RegM** در استرپتوکوک موتانس منجر به کاهش بسیار قوی در بیان پروموتر **gtfB/C** می‌گردد. سایرعوامل حاصل از ژن‌ها: **luxS** (خودالقاگر سنتزکننده کد **AI-2**) که بر بیان ژن **gtfB** و **gtfC** اثر دارد و همچنین **ropA** (کد کننده فاکتور راه اندازی) که تولید **GtfB** و **GtfD** تنظیم می‌نماید. همچنین، سیستم انتقال سیگنال **VicRK** بر بیان فیزیولوژیکی **GTFS** تاثیر می‌گذارد. در یک سویه جهش یافته از موتانس فاقد این سیستم، کاهش قابل توجهی در بیان ژن **gtfD**، و همچنین افزایش بیان ژن **gtfB** ، مشاهده شد.

ژن **gtfD** دور از ژن های دیگر قرارگرفته و ترکیب اسیدآمینه آن با (۵۰ درصد همولوژی) مشخص شده و تحت مکانیسم‌های نظارتی مختلف است. بیان آن نیز به طور اختصاصی توسط یون مس تحریک می‌شود. به غیر از **GTFS**، سنتز و ساختار گلوکان نیز توسط آنزیم موتاناز و آلفا ۶،۱- گلوکوزیداز است. بنابراین، ساختار گلوکان در ماتریس بیوفیلم متغیر است، و در پلاک دندان بالغ، پلی ساکاریدهای نامحلول در آب غالب هستند. گلوکان نیز در تشکیل پلاک دندان و چسبیدن محکم میکروارگانیسم‌ها به سطح دندان و در نتیجه تجمع اسید و شروع دکلسیفیکاسیون در سطح مینا نقش دارد (کامیا[1] و همکاران، ۲۰۰۵؛ صالحی[2] و همکاران، ۲۰۱۱).

زیستگاه خاصی که میکروارگانیسم‌ها مرتبط با آن فعالیت کرده و زنده می‌مانند را اکوسیستم گویند. فعالیت هر میکروارگانیسم در زیستگاه خاص، مربوط به نقشی است که آن در بین اجتماع میکروارگانیسم‌ها دارا می‌باشد. این نقش توسط خواص بیولوژی هر توده یا جمعیت مشخص می‌گردد. دهان به عنوان یک اکوسیستم با چندین زیستگاه می‌باشد. به طوری که هر یک مناسب رشد و فعالیت تعدادی میکروارگانیسم است. زیستگاه‌های دهان را می‌توان مخاط، لب‌ها، گونه‌ها، زبان، سطوح دندان‌ها، لثه، بزاق، ناحیه لوزه‌ها و سطح دندان‌های مصنوعی نام برد (جوناید، ۲۰۱۳).

خواص زیستگاه‌های دهان هرگز بصورت طولانی پایدار نبوده و همواره دستخوش تغییرات وسیعی می‌شود. با کشیدن دندان، گذاشتن دندان مصنوعی، جرم گیری و پرکردن دندان، اکوسیستم دهان تغییر می‌کند. تغییرات موقت اکوسیستم دهان بر حسب نوع غذای مصرفی و آنتی بیوتیک‌ها نیز ممکن است اتفاق بیفتد. دندان‌ها و بزاق، دهان را از دیگر زیستگاه‌های موجود در بدن انسان و سایر موجودات متمایز می‌سازد. قبل از رویش دندان‌های شیری و دوره‌های دندان‌های شیری و دندان‌های دائمی، هریک شرایط اکولوژی خاصی را در دهان بوجود می‌آورند.

پلاک دندانی یک رسوب چسبندهٔ میکروبی است که بر روی سطوح نسج سخت در دهان تشکیل می‌شود و شامل باکتری‌های زنده، مرده، باکتری‌های در حال مردن و محصولات آنها به همراه ترکیبات میزبان که اساساً مشتق شده از بزاق میزبان می‌باشد. ارگانیسم‌های پلاک دندانی با یک ماتریکس آلی احاطه می‌شوند که حدود ۳۰ درصد از حجم پلاک را شامل می شوند. ماتریکس از محصولات میزبان و اجزاء پلاک مشتق می‌شود. در محل لثه پروتئین‌های اگزودای شیاری جزو ترکیبات پلاک می‌شوند. این

[1] Kamiya
[2] Salehi

www.SID.ir

ماتریکس مانند سیمانی که باعث اتصال ارگانیسم‌ها هم به یکدیگر و هم به سطوح مختلف می‌شود. ترکیبات میکروبی پلاک دندانی تنوع وسیعی بین افراد دارد. در برخی مردم پلاک دندانی سریع تشکیل می‌شود و در برخی آرام (سامارانکی و همکاران، ۲۰۱۷).

استرپتوکوک موتانس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که فلور حفره دهانی در انسان می‌باشد. این باکتری مهمترین عامل پوسیدگی و کرم‌خوردگی دندان است (ریان[1] و همکاران، ۲۰۰۴) . ۲۵ گونه از استرپتوکوک‌های دهانی تاکنون کشف شده است. هر یک از این گونه‌ها، جایگاه‌های خاصی از دهان را اشغال می‌کنند. عدم تعادل بین میکروفلور دهانی موجب پیدایش بیماری‌های دهان و دندان خواهد شد. استرپتوکوک موتانس با تخمیر سوکروز و تولید اسید لاکتیک موجب صدمه به مینای دندان می‌شود. همچنین این باکتری از سوکروز برای ساخت پلاک دندانی استفاده می‌کند. پلاک دندانی از دکستران که نوعی پلی ساکارید است ساخته می‌شود (لوچه[2] ۱۹۹۶).

آنتی ژن استرپتوکوکوس موتانس عبارتند از: **Glucosyltransferase(Gtf)- Ag I/II(PAc or P1)- Collagen binding protein cnm- Lipoteichoic acid(LTA)**

این ۴ آنتی ژن از نظر ساختار و عملکرد با یکدیگر متفاوتند که به تفکیک هر کدام را مورد بررسی قرار می‌دهیم.

- **Glucosyltransferase(Gtf)**

گلوکوزیل ترنسفراز یک آنزیم خارج سلولی است که در برخی باکتری‌های موجود در حفره دهان نظیر **Streptococcus mutans** وجود دارد. این آنزیم ساکارز موجود در مواد غذایی را به گلوکان تبدیل می کند و از این طریق باعث ایجاد پوسیدگی در سطح دندان می شود (کروگر[3] و همکاران، ۲۰۰۴).

این آنزیم از ۲ بخش اصلی **C -terminal glucan-binding domain (GBD)** و **N-terminal catalytic domain** تشکیل شده است.

استرپتوکوکوس موتانس سه ژن **Gtf** را حمل می‌کند : **GtfB** که گلوکان نامحلول در آب تولید می‌کند. **GtfD** که گلوکان محلول در آب تولید می کند و **GtfC** که غالبا گلوکان نامحلول و کمی گلوکان محلول تولید می‌کند (کروگر و همکاران، ۲۰۰۴).

- **Ag I/II(PAc or P1)**

یکی دیگر از آنتی‌ژن‌های سطحی استرپتوکوک موتانس پروتئین **P1** است. پروتئین **P1** یک پروتئین سطحی با چندین بخش (دومین) و چندین عملکرد می‌باشد که توسط ژن **spaP** کد می‌شود. نام‌های دیگر این پروتئین آنتی‌ژن **I/II (Ag)** یا **PAc** است. این آنتی ژن باعث اتصال باکتری استرپتوکوک موتانس به **salivary pellicle** (لایه نازکی از پروتئین‌های بزاق که سطح دندان را می‌پوشانند) می‌شود (کرولی[4] و همکاران، ۲۰۰۸).

[1] Ryan
[2] Loesche
[3] Kruger
[4] Crowley

www.SID.ir

قطعه **N** ترمینال حاوی ۳۸ اسید آمینه، بخش غنی از آلانین حاوی سه قسمت تکراری۸۲ اسید آمینه‌ای (**A region**)، بخش متغیر حاوی ۱۴۴ اسید آمینه (**V region**)، بخش مرکزی غنی از پرولین حاوی تکرارهای ۳۹ اسیدآمینه‌ای (**P region**) و بخش **C terminal** حاوی موتیف **LPXTG** می‌باشد (کرولی و همکاران، ۲۰۰۸).

- **Lipoteichoic Acid(LTA)**

LTA یکی از اجزای اصلی موجود در دیواره باکتری‌های گرم مثبت است. ساختار **LTA** بین گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت متفاوت است و شامل زنجیره‌های بلند ریبیتول فسفات یا گلیسرول فسفات می‌باشد (هانگ[1] و همکاران، ۲۰۱۴).

LTA موجود در *استرپتوکوک موتانس* از اجزای اصلی غشای خارجی این باکتری می‌باشد. **LTA** مسئول اتصال *استرپتوکوک موتانس* به هیدروکسی آپاتیت (از اجزای اصلی عاج دندان) می‌باشد (هانگ و همکاران، ۲۰۱۴).

- **Collagen-Binding Protein Cnm**

پروتئین **cnm** از دو دومین **A** و **B** تشکیل شده است. دومین **A** که دومین حفاظت شده متصل شونده به کلاژن است و دومین **B** که دومین تشکیل شده از نواحی تکراری غنی از ترئونین متصل شونده به دیواره باکتری است (اولیس‌ری[2] و همکاران، ۲۰۱۴).

cnm عمدتاً در گونه‌های متعلق به سروتیپ نامعمول **f** یا **k** یافت می‌شود. به دلیل ترکیب کلاژنی عاج و ریشه دندان تصور می‌شود که **cnm** پوسیدگی این سطوح را تسهیل می‌بخشد (اولیس‌ری و همکاران، ۲۰۱۴).

بیوفیلم کمپلکسی مرکب از میکروارگانیسم‌هایی است که به یکدیگر در روی سطحی متصل شده‌اند. تشکیل بیوفیلم نیاز به اتصال اولیه باکتری‌ها به یک سطح دارد و ازدیاد جمعی باکتریایی به دنبال آن رخ می‌دهد. میکروارگانیسم‌هایی که بیوفیلم را تشکیل می‌دهند عمدتا استرپتوکوک موتانس و باکتری‌های بی‌هوازی با ترکیبی که در نقاط مختلف دهان متفاوت است می‌باشند. از زمره باکتری‌های بی‌هوازی دخیل در بیوفیلم می‌توان به فوزوباکتریوم و اکتینوباکتریا اشاره نمود. این باکتری‌ها به طور معمول در دهان وجود دارند و بی‌ضررند ولی بدون حذف لایه زیستی توسط مسواک این باکتری‌ها بر روی دندان‌ها تجمع یافته و موجب بیماری‌های دندان می‌گردند. *استرپتوکوکوس موتانس* از طریق متابولیزه کردن کربوهیدرات‌های مختلف محیط اسیدی ایجاد می‌کند. قابلیت *استرپتوکوک موتانس* برای سنتز گلوکان خارج سلولی عامل بیماری‌زایی اصلی این باکتری‌ها بوده و عامل ایجاد کننده‌ی پوسیدگی‌های دندانی در انسان است (ساسواتی[3] و همکاران، ۲۰۰۵).

با توجه به ادبیات مطرح شده، فرضیه مورد بررسی در تحقیق حاضر به شرح زیر تعریف شده است:

- ژن **gtfB** و **gtfC** در باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در تشکیل بیوفیلم پلاک دندانی مؤثر است.

[1] Hong
[2] Aviles-Reyes
[3] Saswati

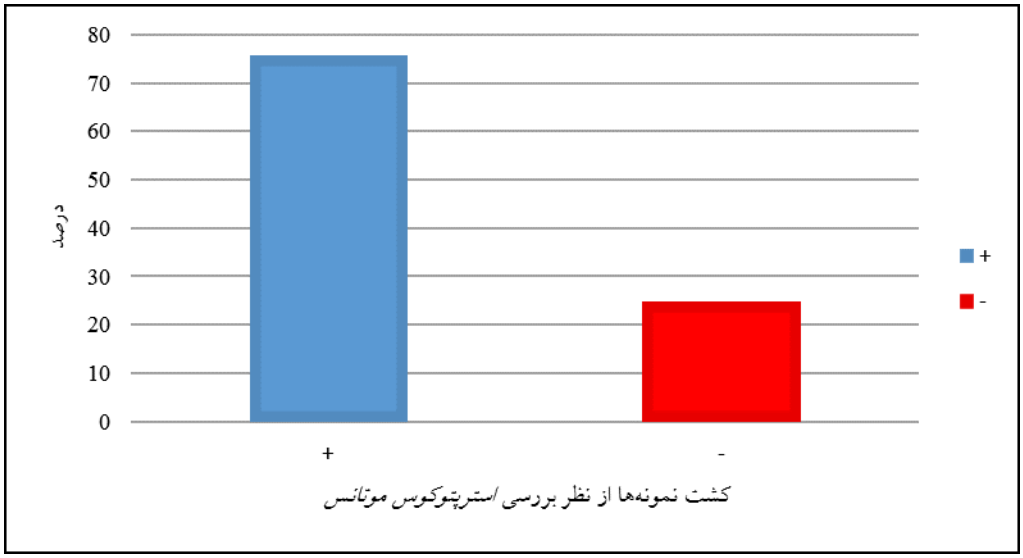
www.SID.ir

نتیجه گیری

این مطالعه بر روی ۶۱ نمونه از پلاک‌های دندانی جمع آوری شده از کلینیک دندان پزشکی سیب (پاستور همدان) انجام گرفت. نتایج حاصل از کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت انتخابی و اختصاصی نشان داد که در مجموع ۴۶ مورد از کل نمونه-ها، از نظر استرپتوکوک مثبت بودند.

جدول (۲): نتایج حاصل از کشت نمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت انتخابی و اختصاصی

تعداد (درصد)	نتیجه آزمایش
۴۶ (۷۵/۴۱)	کشت مثبت استرپتوک
۱۵ (۲۴/۵۹)	کشت نمونه‌های غیر استرپتوک



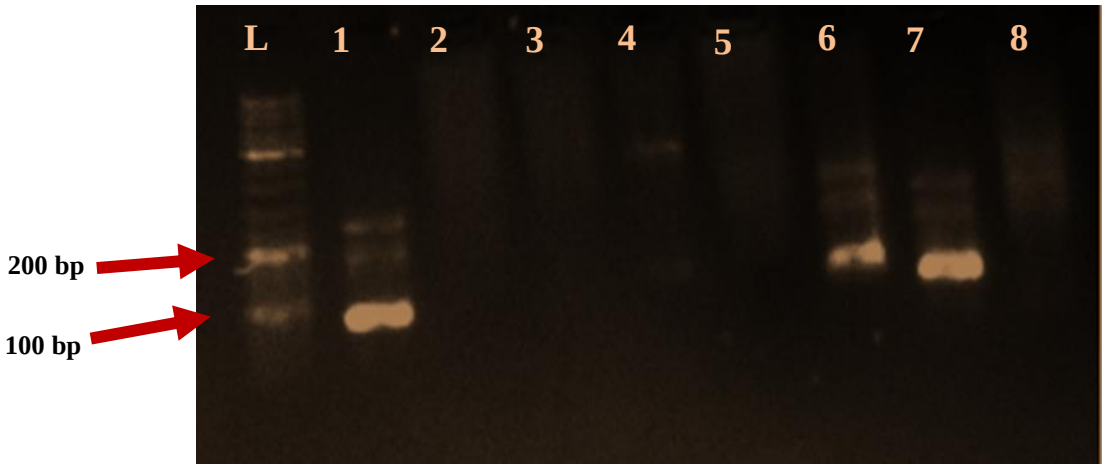
نمودار (۱) نتایج حاصل از کشت نمونه‌های پلاک دندان

با توجه به آزمایشات صورت گرفته و بررسی محیط کشت‌ها و شمارش گونه باکتریایی عامل پلاک دندان در این مطالعه، اطلاعات بدست آمده بدین ترتیب بود که باکتری *استرپتوکوک موتانس* با (۷۵/۴۱ درصد) ۴۶ مورد مهم‌ترین عامل پوسیدگی دندان به‌شمار می‌رود. همچنین تعداد *استرپتوکوک‌موتانس* شناسایی شده در این مطالعه در مردان (۶۷/۴ درصد) ۳۱ مورد و زنان (۳۲/۶ درصد) ۱۵ مورد بود. پس از آن باکتری‌های جنس لاکتوباسیل با (۱۸/۰۳ درصد) و سایر گونه‌های باکتریایی که شامل باکتری‌های گرم مثبتی مانند اکتینومیسس‌ها و ... با (۶/۵۶ درصد) عوامل بعدی موثر در ایجاد پلاک دندان محسوب می‌شوند

www.SID.ir

بر اساس نتیجه آزمایش **PCR** جهت شناسایی و تعیین ژن **gtfB/C** مشخص گردید که از ۴۶ ایزوله مورد مطالعه تنها ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن **gtfB** و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن **gtfC** بودند. شکل (۳) نتیجه آزمون **PCR** نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن‌های **gtfB/C** را نشان می‌دهد. طول قطعه **DNA** تکثیر شده برای ژن **gtfB**، **bp** ۵۱۷ و برای ژن **gtfC**، **bp** ۲۰۶ بود.

شکل (۳): نتایج **PCR** مربوط به ژن **gtfB**. از سمت چپ نشانگر **bp** ۱۰۰، کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های ۳، ۵، ۹ و ۱۰ از نظر وجود ژن **gtfB** با طول باند **bp** ۵۱۷ مثبت می‌باشند.



شکل (۴): نتایج **PCR** مربوط به ژن **gtfC**. از سمت چپ نشانگر **bp** ۱۰۰، نمونه‌های ۱، ۶ و ۷ از نظر وجود ژن **gtfC** با طول باند **bp** ۲۰۶ مثبت می‌باشند.

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

انجام خدمات دندان‌پزشکی، مسواک نزدن و استفاده از خلال دندان به منظور تمیز کردن آن، می‌تواند عامل ایجاد باکتریمی گذرا ناشی از استرپتوک موتانس گردد. استرپتوکوک‌های دهانی به ویژه استرپتوک موتانس، از عوامل مؤثر در ایجاد پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال شناخته شده است (سلطان دلال و همکاران، ۲۰۱۳). بر اساس گزارش‌های بدست آمده، پوسیدگی-های دندانی در ۹۵ درصد افراد جامعه وجود دارد. اگرچه تعداد زیادی میکروارگانیسم از حفره دهان عبور می‌کنند، ولی ندرتا به صورت دایمی در دهان جایگزین می‌شوند. سطح دندان جایگاه اکولوژیکی بسیار مناسبی برای استقرار *استرپتوکوکوس موتانس* است. از طرفی رقابت جهت اشغال جایگاه‌ها (شیار وسطح دندان) توسط فلور طبیعی باعث ثبات ترکیب مجموعه‌های پلاک دندانی می‌شود. در پوسیدگی دندان مهم‌ترین عامل، *استرپتوکوکوس‌موتانس* به سطوح مختلف دهان و دندان می‌باشد. به طوری که محققان حضور *استرپتوکوکوس‌موتانس* را به، ارتباط مستقیم با پوسیدگی دندانی گزارش می‌کنند. *استرپتوکوکوس موتانس* در گروه آلفا همولیتک ویریدانس قرار می‌گیرد. این باکتری، توانایی تولید مواد پلیمری چسبناک و تشکیل بیوفیلم بر سطح مینای دندان را دارد. *استرپتوکوکوس موتانس* با تخمیر مواد قندی تولید مقدار زیادی اسید می‌کند که باعث حل شدن مواد معدنی سطح مینای دندان و ایجاد پلاک‌های دندانی شده و در نهایت پوسیدگی دندانی حاصل می‌شود. یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی **S.mutans** قابلیت تشکیل بیوفیلم در بین سایرباکتری‌ها است. تشکیل بیوفیلم نیاز به اتصال اولیه باکتری‌ها به یک سطح دارد و ازدیاد جمعیت باکتریایی به دنبال آن رخ می‌دهد. بیوفیلم‌های دهانی تحت تاثیر استرس‌های مختلف محیطی مانند نوع مواد غذایی و **pH** اسیدی می‌توانند ایجاد شوند (ناپیموگا[1] و همکاران، ۲۰۰۵؛ پترسون[2] و همکاران، ۲۰۰۶).

نتایج به دست آمده نشان داد میزان جذب نوری بیوفیلم تولیدی توسط نمونه‌های استرپتوکوک موتانس جداشده از بیماران با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین میزان جذب مربوط به باکتری استرپتوکوک موتانس شماره ۱۹ به مقدار ۱/۴۳ می‌باشد. همچنین از روش **PCR** جهت شناسایی ژن‌های **gtfB/C** استرپتوکوک موتانس استفاده شد و نتایج نشان داد که از ۴۶ نمونه مورد مطالعه ۱۹ جدایه (۴۱/۳۰ درصد) واجد ژن **gtfB** و ۸ مورد (۱۷/۴ درصد) واجد ژن **gtfC** بودند. ژن‌های **gtf** در فرآیند تولید پلیمرهای گلوکان و اتصال باکتری به سطوح دارای اهمیت زیادی می‌باشند. افزایش مقدار بیان آن‌ها در حالت بیوفیلم نسبت به فرم پلانکتونی این موضوع را تایید می‌کند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که میزان بیان ژن **gtfB** در حالت بیوفیلم چهار برابر نسبت به حالت پلانکتونیک افزایش می‌یابد (یوشیدا[3] و همکاران، ۲۰۰۲). بررسی‌ها دیگر نشان می‌دهد که این ژن از نظر انتشار عوامل حدت و ایجاد پلاک دارای فراوانی‌های متفاوت می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌گردد که به بررسی مواد ضد میکروبی بر ماده بیوفیلم متشکل از انواع استرپتوکوک-های دهانی به منظور کاهش پوسیدگی و پروفایل آنتی‌بیوتیکی این باکتری، هرساله انجام شود تا شیوه درمانی مناسب ارائه گردد.

[1] Napimoga
[2] Peterson
[3] Yoshida

www.SID.ir

همچنین پیشنهاد می‌شود بتوان با استفاده از پروبیوتیک‌ها به طور انتخابی باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان را مهار و فلور میکروبی دهان را تعدیل کرد.

منابع:

_ Irajian Gh, Boroumand M, Rashid Moridi F, Rahbar M, Shahcheraghi F et al. (2012) **Performance standard of microbial susceptibility testing by disk diffusion method. Health laboratory**. Tehran Marker Sadra Publishing 164_1.

_ Salari Mohammad Hossein, et al. (2001). **Oral Microbiology. First Edition, Tehran University of Medical Sciences, 16_14.**

Aviles-Reyes, A., et al., 2014. **Cnm is a major virulence factor of invasive Streptococcus mutans and part of a conserved three-gene locus**. Mol Oral Microbiol,. 29(1): p. 11-23.

– Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, et al. 2001. **Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children.** Eur J Oral Sci; 109(6): 388-92.

– Crowley, P.J., et al., 2008. **Requirements for surface expression and function of adhesin P1 from Streptococcus mutans.** Infect Immun,. 76(6): p. 2456-68.

– Facklam R. 2002. **What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes**. Clin Microbiol Rev; 15(4): 613-30.

– Harris R, Nicoll AD, Adair PM & Pine CM. 2004. **Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature**. Community Dent Health; 21(1): 71-85.

– Hong, S.W., et al., 2014. **Lipoteichoic acid of Streptococcus mutans interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macropHages.** Mol Immunol,. 57(2): p. 284-91.

www.SID.ir

– Junaid S, Dileep N, Rakesh KN, Kekuda PTR. 2013. **Anticaries activity of selected plants against clinical isolates of Streptococcus mutans**. Asian Journal of PHarmacy and Technology. 3:105-106.

– Kamiya RU, Napimoga MH, Hofling JF, Goncalves RB. 2005**. Frequency of four different mutacin genes in Streptococcus mutans genotypes isolated from caries-free and cariesactive individuals**. J Med Microbiol; 54(Pt6): 599-604.

– Koo H, Xiao J, Klein MI. 2009. **Extracellular polysaccharides matrix—an often forgotten virulence factor in oral biofilm research**. Int J Oral Sci. 1:229-234.

– Kruger, C., et al., 2004. **The effects of egg-derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats.** Caries Res,. 38(1): p. 9-14.

– Loesche WJ (1996). "**Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease**". In Baron S et al.. Baron's Medical Microbiology (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

– Marsh, P. D. (2005). **Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style.** J Clin Periodontol 32 (Suppl. 6), 7–15.

– Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Hofling JF, Mattos-Graner RO, et al. 2005. **Genotypic diversity an virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals**. J Med Microbiol; 53: 697–703.

– Novak J, Caufield PW, Miller EJ. 1994. **Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from Streptococcus mutans**. J Bacteriol; 176(14): 4316-20.

– Peterson FC, Fimland G, Scheie AA. 2006. **Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in Streptococcus mutans**. Mol Microbiol; 61: 1322-34.

– Ryan KJ, Ray CG (editors) (2004). **Sherris Medical Microbiology (4th ed.).** McGraw Hill. . ISBN 0-8385-8529-9

– Salehi M, Moradi S, Aghili T, Razavipor R. 2011**. Exploration of mutacin genes I/III and II in Streptococcus mutans isolated from Iranian patients**. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch; 21(2): 89-96. [In Persian].

– Samaranayake L, Matsubara VH. 2017**. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem.** Dent Clin North Am;61(2):199-215.

www.SID.ir

– Soltan Dallal MM, Dargahi H, Mehrani F, Sharifi Yazdi MK, Rahimi Forushani A, Miremadi A. 2013. **The role Of streptococcus mutants In dental caries in two groups of sensitive and resistance children age between 3 to 5 tears**. Payavard Salamat; 6(6): 467-77. [In Persian].

– Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. 2002. **Real-time PCR for quantification of Streptococcus mutans.** FEMS Microbiol Lett 217(1): 23-30.

– Yoshida A, Kuramitsu H. 2002. **Streptococcus mutans biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB::gfp) construct to monitor**

_development Microbiology; 148(Pt 11): 3385-94.

www.SID.ir

2nd National Conference on Interdisciplinary Research in Management & Medical Science
16th September 2021-Tehran
دومین همایش ملی تحقیقات میان رشته ای در مدیریت و علوم پزشکی
محل برگزاری: تهران ۲۵ شهریور ۱۴۰۰

Study of genes Streptococcus mutans GtfB and GtfC involved in biofilm formation of dental plaque

Gharekhani Fatemeh MSc 1, Momen Amirhossein PhD 2,3

1. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
3. Department of applied science University of Québec Chicoutimi (UQAC), Chicoutimi, QC, CanadaAbstract

Abstract

Background and Aims: The aim of this study was to evaluate the effective genes of gtfB and gtfC of Streptococcus mutans in the formation of dental plaque biofilm.

16

Materials and Methods: This research is an experimental-laboratory study. Data analysis and graphing were performed using SPSS software version 24.

Results: Based on the results of PCR test to identify and determine gtfB / C gene, it was found that out of 46 isolates studied, only 19 isolates (41.30%) had gtfB gene and 8 cases (17.4%) had gtfC gene. Figure (3) shows the PCR test results of positive samples for the presence of gtfB / C genes. The length of the amplified DNA fragment was 517 bp for the gtfB gene and 206 bp for the gtfC gene.

Conclusion: Streptococcus mutans produces a large amount of acid by fermenting sugars, which dissolves minerals on the surface of tooth enamel and creates dental plaque, and eventually tooth decay.

www.SID.ir