



نقش آنتی بیوفیلمی تریکلوزان بر جدایه های استرپتوکوکی واجد سورتاز A در کنترل پوسیدگی دندان

فاطمه حجازی نیا، لیلا فزونی*

گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
مقدمه یکی از رایج ترین مشکلات دوران کودکی، پوسیدگی دندان بوده و استرپتوکوکوس موتانس رایج ترین باکتری عامل عفونت دندان است. این مطالعه با هدف بررسی اثر تریکلوزان بر تشکیل بیوفیلم ناشی از فعالیت آنزیم سورتاز A استرپتوکوکی در کنترل پوسیدگی دندان انجام شد. مواد و روش ها در این مطالعه تجربی، ۱۵۰ نمونه از سطح بوکال و لینگوال دندان های خلفی دانش آموزان دبستانی در گرگان، طی سال ۱۳۹۸ گرفته شد. سویه های استرپتوکوکوس موتانس با استفاده از تست های میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی شدند. ژن SrtA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی شناسایی شد. حداقل غلظت مهار تریکلوزان بر جدایه ها به روش میکروداپلوشن براث تعیین شد. تشکیل بیوفیلم و اثرات ضد بیوفیلمی تریکلوزان به روش میکروتیتر پلیت اصلاح شده بررسی شد. یافته ها فراوانی استرپتوکوکوس موتانس ۱۵/۳ درصد بود که ۸۷٪ آن ها قادر به تولید بیوفیلم بودند. ۱۹ جدایه (۸۲/۶٪) واجد ژن SrtA شناسایی شد. حداقل غلظت مهار تریکلوزان که رشد ۵۰٪ جدایه ها را مهار کرد (MIC₅₀)، ۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود که ۸ برابر کمتر از غلظت لازم برای مهار رشد ۹۰ درصد جدایه ها بود (MIC₉₀=64 μg/ml)، به طوری که ۹۰٪ جدایه ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم در غلظت MIC بودند. نتیجه گیری نتایج نشان داد که بین حضور سورتاز A و تشکیل بیوفیلم باکتریایی ارتباط وجود دارد و تریکلوزان اثر ضد بیوفیلمی خوبی را در شرایط آزمایشگاهی نشان داد. کلیدواژه ها استرپتوکوکوس موتانس، سورتاز A، تریکلوزان، اثر ضد بیوفیلم	تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹ *نویسنده مسئول: دکتر لیلا فزونی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی تلفن: ۰۹۱۱۵۱۸۶۷۴ پست الکترونیک: lili_kia@yahoo.com



مقدمه

عفونت دهان و دندان یکی از شایع ترین علل تهدیدکننده سلامت انسان محسوب می شود که علت اصلی ایجاد آن انواع میکرو ارگانیسم‌ها بویژه باکتری‌هایی می‌باشند که بطور طبیعی در دهان زندگی می‌کنند و می‌توانند به طرق گوناگون از عفونت‌های دهانی به دیگر ارگان‌های بدن مثل قلب و ریه راه یابند و در ایجاد بیماری‌های سیستمیک و اندوکاردیت عفونی دخالت کنند. استرپتوکوک‌های ویریدنس، از شناخته‌شده‌ترین ارگانیسم‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم‌ دندان در انسان هستند و به عنوان پیشرو در تشکیل پلاک‌ دندان و پوسیدگی دندان شناخته می‌شوند (۱، ۲). بیوفیلیم‌های باکتریایی در واقع تجمعاتی از باکتری‌ها هستند که در یک ماده چسبناک پلی مریک خارج سلولی^۱ تولید شده توسط خودشان محصور شده‌اند. این ماده چسبناک خارج سلولی عمدتاً از پلی ساکاریدها و سایر انواع بیومولکول‌ها مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و نوکلئیک اسیدها تشکیل شده است (۳). بیوفیلیم‌ها سیستم‌های پیچیده‌ای هستند که تراکم سلولی خیلی بالایی (حدود 10^8 تا 10^{11} عدد سلول باکتریایی در هر گرم) دارند و حاوی جمعیت میکروبی بسیار متنوعی می‌باشند (۴). پلاک‌ دندان یک بیوفیلیم با ساختمان فضایی است که از جامعه میکروبی پیچیده‌ای تشکیل شده است (۵). اجزای میکروبی سازنده بیوفیلیم پلاک‌ دندان شامل برخی از اجزای باکتریایی مانند گلیکوزیل ترانسفرازها^۲ و گلوکان می‌باشند. استرپتوکوک‌های ویریدنس نظیر *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس سانگوئینیس* و *استرپتوکوکوس اورالیس* از اولین باکتری‌های کلونیزه‌کننده بر روی سطح دندان می‌باشند. بار منفی سطح دیواره سلولی باکتری‌ها، اتصال آنها

را به مولکول‌های گیرنده با بار مثبت بر سطح پلیکل تسهیل می‌کند (۶). سورتاز A به عنوان یک ترانس پپتیداز ضروری مسئول مرتب کردن و اتصال به پروتئین‌ها در دیواره باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* به شمار می‌رود. غیر فعال کردن ژن سورتاز A می‌تواند سبب نقص در بیماری‌زایی شود (۷، ۸). برای مثال پروتئین Pac از *استرپتوکوکوس موتانس* در سویه‌هایی که سورتاز A در آنها غیر فعال است نمی‌تواند به دیواره سلولی متصل شود که سبب جلوگیری سویه‌های جهش یافته از کلونیزاسیون بر روی دندان و تشکیل بیوفیلیم می‌شود و متعاقب آن باعث کاهش پوسیدگی می‌شود (۹). بنابراین گمان می‌شود که سورتاز A دارای یک نقش حیاتی در پاتوژنز باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* باشد.

گرچه ترکیبات دارویی و ضد میکروبی گوناگونی برای پیشگیری و درمان پوسیدگی دندان به صورت تجاری در دسترس هستند لیکن پوسیدگی دندان همچنان از معضلات اصلی عموم بوده و درمان آن مخارج سنگینی بر افراد و جوامع تحمیل می‌کند. از طرفی پدیده مقاومت‌های دارویی در کنترل و درمان عفونت‌های دهان و دندان رو به گسترش است (۱۰، ۱۱) لذا استفاده از ترکیبات خاص با اثر بخشی بیشتر برای پیشگیری، کنترل و درمان پوسیدگی دندان مد نظر قرار گرفته است. تریکلوزان یک مولکول غیر یونی با طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است؛ به طور خاص تریکلوزان دارای فعالیت ضد التهابی است چون ترشح سایتوکاین را با سلول‌های میزبان نظیر فیبروبلاست‌های لثه کاهش می‌دهد. شواهد نشان می‌دهد که توانایی تریکلوزان برای مهار گلیکولیز این باکتری و تشکیل بیوفیلیم ممکن است مسئول اثرات ضد پوسیدگی دندان باشد (۱۲) در این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی به بررسی قدرت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی تریکلوزان در جدایه‌های

1. Extracellular Polymeric Substances, EPS
2. Glycosyl transferases



استرپتوکوکوس موتانس دارای آنزیم سورتاز A به منظور
پیشگیری از پوسیدگی دندان تمرکز شده است.

مواد و روش‌ها

جمعیت باکتریایی و جداسازی: در این مطالعه تجربی
نمونه‌های شیار دندانی ۱۵۰ دانش‌آموز دبستانی ۱۲-۷ ساله
(با نسبت یکسان جنسیتی) در گرگان طی سال ۲۰۱۹ طبق
رعایت موازین اخلاق پزشکی و کسب رضایت حاصل شده
بود. دانش‌آموزانی که در ۳ ماه قبل آنتی بیوتیک مصرف
کرده یا بیماری‌های سیستمیک و ضعف ایمنی داشتند از
مطالعه خارج شدند. این مطالعه ضمن رعایت اخلاق
پژوهش، در دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علی آباد کتول
بررسی و با شناسه اخلاق "IR.IAU.AK.REC.1398.007"
مصوب گردید. نمونه‌ها به وسیله‌ی سوآب استریل و نخ
دندان از سطح بوکال و لینگوال دندان‌های خلفی جمع‌آوری
و به لوله‌های حاوی BHI براث (مرک، آلمان) واجد بافر
انتقال داده شدند؛ سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور در
دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند.
در آنالیز میکروبی پس از انکوباسیون نمونه‌ها با ورتکس به
صورت یکنواخت درآمده و بر روی محیط کشت بلاد آگار
(مرک، آلمان) حاوی ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند کشت و به
مدت ۲۴ ساعت در شرایط حضور دی اکسید کربن ۵٪، در
دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند؛ پس از مشاهده رشد
بر اساس مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی گرم، نوع همولیز،
آزمایش کاتالاز، تجزیه اسکولین، حساسیت به اپتوجین،
تست متیل رد/ وژرسکوئر، آرژنین دهیدرولاز و تست‌های
تخمیر قند مانیتول، لاکتوز، سالیسین و تره هالوز
استرپتوکوک‌های موتانس شناسایی و جدا گردیدند.

**شناسایی مولکولی آنزیم سورتاز A در استرپتوکوکوس
موتانس:** جهت استخراج DNA باکتری از روش جوشاندن^۱
طبق روش آنتونسون (Antonsson) و همکارانش با بعضی
اصلاحات انجام شد. به این منظور چندین کلنی خالص
باکتری در ۵۰ میکرولیتر محلول STE^۲ حل شد
(سوسپانسیون حاصل به مدت ۸-۷ دقیقه در بن ماری (۹۶
درجه سانتیگراد) قرار داده شد و در دور ۳۳۰۰ rpm به
مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی به میکروتیوپ
جدیدی منتقل شد و جهت انجام PCR مورد استفاده قرار
گرفت. در بررسی ژنوتیپی به روش PCR، پس از استخراج
DNA با عمل جوشاندن از پرایمرهای اختصاصی:

(پیش روننده: 5'-

CCTCTAGATTAATAATGATATTTGATTATAGG

3'- (ACTG و (پس روننده: 5'-

3'- (CTGAATTCTACCCGACTAAAGGACG

برگرفته از بانک ژنی شماره AF162657 استفاده شد (۱۳).
برای انجام PCR، حجم نهایی نمونه ۲۵ میکرولیتر در نظر
گرفته شد که شامل ۱ میکرولیتر از نمونه DNA، ۱
میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده،
۰/۵ میکرولیتر از dNTP، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR، ۰/۷۵
میکرولیتر از کلرید منیزیم، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq
پلیمرز (۵U/μL) و ۱۸/۰۵ میکرولیتر آب مقطر بود. واکنش
PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient)
ساخت کشور آمریکا با شرایط واسرشت شدن ابتدایی و
اصلی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۱
دقیقه با یک چرخه کامل، اتصال در دمای ۶۴ درجه
سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و طویل شدن در دمای ۷۲
درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه با ۳۵ سیکل، گسترش
نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با

1. Boiling

2. Sodium Chloride-Tris-EDTA



عنوان بیوفیلیم، ضعیف، $0.3-0.2$ به عنوان بیوفیلیم متوسط و بیش از 0.3 به عنوان بیوفیلیم قوی ارزیابی شدند (۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی تریکلوزان بر جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس به روش میکرودایلوشن براث: ابتدا از استوک اولیه تریکلوزان در رنج $128-0.25$ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقت‌سازی انجام شد (۱۵). به منظور انجام تست، 50 میکرولیتر از رقت‌های تریکلوزان به چاهک‌های میکروپلیت‌های ال ای‌زای ۹۶ خانه‌ای حاوی 50 میکرولیتر مولر هینتون براث تلقیح شد، سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس با غلظت 0.5 مک فارلند تلقیح گردید. پس از انکوباسیون در شرایط حضور 5 درصد دی‌اکسیدکربن، میزان رشد در مقایسه با چاهک کنترل مثبت رشد که فاقد تریکلوزان بوده و همچنین با چاهک شاهد فاقد ارگانیسم (کنترل منفی) سنجیده شد. در نحوه گزارش MIC از دستگاه ال ای‌زا ریدر (BioTec, Germany) در 630 نانومتر استفاده شد.

بررسی اثرات ضد بیوفیلمی تریکلوزان: اثرات ضد بیوفیلمی تریکلوزان با روش میکروتیتیر پلیت اصلاح شده، بررسی شد. به این منظور ابتدا به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای 100 میکرولیتر از محیط تریپتوکیس سوی براث حاوی 2% دکستران، سپس به هر چاهک 50 میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تریکلوزان و 50 میکرولیتر سوسپانسیون از جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس که تولید بیوفیلیم‌شان تایید شده بود، معادل نیم مک فارلند اضافه شد. چاهک بلانک صرفاً حاوی 200 میکرولیتر محیط کشت بود. سپس این میکروپلیت به مدت 24 ساعت در انکوباتور قرار گرفت، باکتری‌ها مشابه روش قبلی تثبیت و رنگ‌آمیزی شدند. آزمایش‌ها سه بار تکرار و پس از خواندن جذب، میانگین داده‌ها مقایسه شد.

یک سیکل کامل انجام گرفت. محصولات PCR به نسبت 5 به یک با بافر نمونه‌گذاری مخلوط شده و هر مخلوط به یک چاهک بر روی ژل آگارز 1 درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند. به منظور مشاهده اندازه باندها از دستگاه Gel Documentation استفاده شد. مشاهده قطعات DNA با ساینز 1035 جفت باز بیانگر حضور ژن *srtA* بود.

بررسی تشکیل بیوفیلیم: به منظور بررسی توانایی تشکیل بیوفیلیم در جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس روش میکروتیتیر پلیت انجام شد. پس از تهیه سوسپانسیون از جدایه‌ها معادل نیم مک فارلند (در 625 نانومتر دارای جذب $0.8-1$ بودند) در محیط TSB براث (مرک، آلمان)، به هر چاهک ال‌ای‌زا 100 میکرولیتر از این محیط به همراه 150 میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و 50 میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. کنترل بلانک چاهک حاوی محیط کشت بدون باکتری بود. سپس میکروپلیت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط $5\% \text{ CO}_2$ انکوبه گردید. پس از دور ریختن محلول روئی هر چاهک و شستشو با PBS، پلیت‌ها قویاً تکان داده شدند تا باکتری‌های نجسبیده جدا شوند. سایر باکتری‌های چسبیده با اتانول 96% فیکس و سپس در هوای آزاد خشک شدند. پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله 2% یک حلقه ارغوانی دور دیواره هر چاهک مشاهده شد. آنالیز کمی بیوفیلیم با افزودن 200 میکرولیتر از محلول گلاسیال استیک اسید 33% به هر چاهک، نگهداری در دمای اتاق به مدت $15-10$ دقیقه و خواندن OD آنها در 492 نانومتر توسط دستگاه ال‌ای‌زا ریدر محاسبه گردید. در این تحقیق از سویه استاندارد استرپتوکوکوس موتانس PTCC35668 به عنوان سویه کنترل مثبت و از استیک اسید 3% در آب مقطر با جذب 550 نانومتر به عنوان بلانک استفاده شد. در ارزیابی میزان بیوفیلیم تشکیل شده، نمونه‌های با OD کمتر از 0.1 فاقد بیوفیلیم، $0.2-0.1$ به



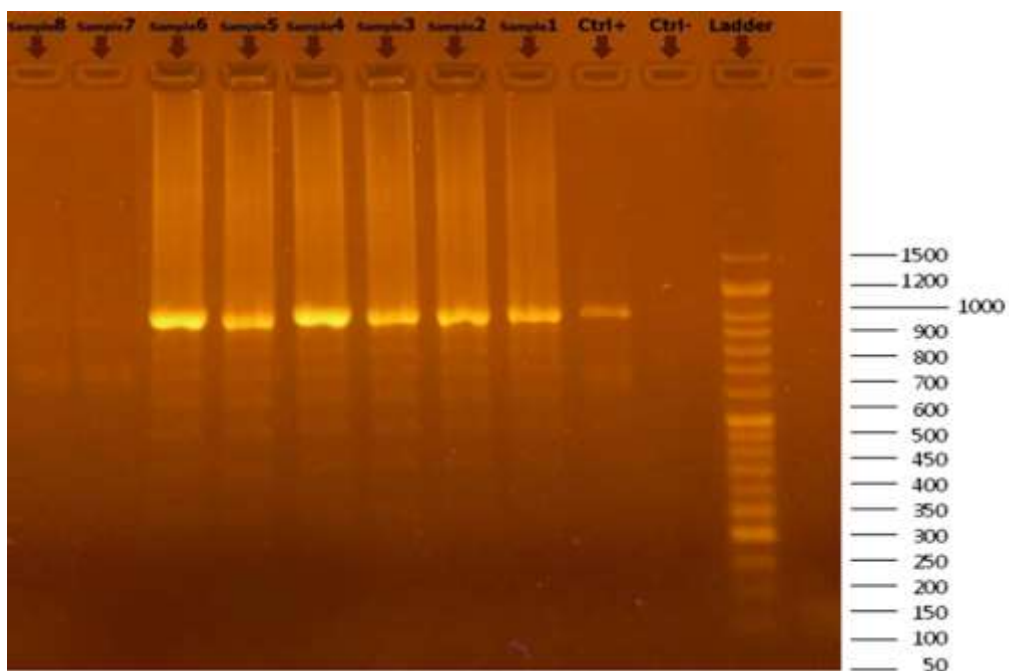
و پسران (۴۸٪) بود. از نظر سنی پراکندگی نمونه‌های مثبت تقریباً یکسان بود.

نتایج بررسی فراوانی سورتاز A: باند مورد انتظار که حاصل تکثیر بخشی از ژن *srtA* بود، قطعه‌ای به طول ۱۰۳۵ جفت باز از DNA را سنتز می‌نمود. حضور این باند در این محدوده تایید کننده صحت واکنش می‌باشد. از ۲۳ جدایه استرپتوکوکوس موتانس، ۱۹ جدایه (۸۲/۶٪) واجد ژن *srtA* شناسایی شد.

کلیه اعداد با استفاده از نرم افزار SPSS ویراست ۲۳ و تست کالموگروف-اسمیرنوف، آزمون ناپارامتری کروسکال والیس و آزمون ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (P-value= 5%).

یافته‌ها

نتایج حاصل از فراوانی استرپتوکوکوس موتانس:
فراوانی استرپتوکوک‌های موتانس ۲۳ جدایه (۱۵/۳٪) برآورد شد که در این بین بیشترین و کمترین میزان فراوانی جدایه‌ها از دانش‌آموزان به ترتیب مربوط به دختران (۵۲٪)



شکل ۱- تشکیل باند محصولات PCR بر روی ژل آگارزا ۱ درصد، ۱-۶ نمونه‌های حاوی ژن *srtA*، ۷-۸ نمونه های فاقد ژن *srtA*، Ctrl+ : کنترل مثبت، Ctrl- : کنترل منفی

باکتری‌ها ممانعت می‌کند (MIC_{90}) تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($P=0.036$). حداقل غلظت مهاری تریکلوزان که رشد ۹۰٪ جدایه‌ها را مهار کرد ($MIC_{90}=64\mu g/ml$) بود که ۸ برابر بیشتر از حداقل غلظت لازم برای مهار رشد ۵۰ درصد

نتایج حاصل از تست میکرودايلوشن براث: بررسی و ارزیابی حداقل غلظت مهاری (MIC) تریکلوزان نشان داد بین حداقل غلظتی از دارو که از رشد ۵۰٪ باکتری‌ها ممانعت می‌کند (MIC_{50}) با حداقل غلظتی از دارو که از رشد ۹۰٪



جدایه‌ها بود ($MIC_{50}=8\mu g/ml$). در این بررسی میانگین MIC تریکلوزان ۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شده است که در رقت‌های ۸ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین تغییرات از نظر رشد مشاهده شد؛ این میانگین بر روی سویه استاندارد/استرپتوکوکوس موتانس ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

نتایج تولید بیوفیلم و خواص آنتی بیوفیلمی تریکلوزان: بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس نشان داد که از ۲۳ جدایه، ۲۰ جدایه (۸۷٪) توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند. بررسی فعالیت آنتی بیوفیلمی غلظت‌های MIC و Sub MIC تریکلوزان نشان داد ۹۰٪ جدایه‌ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم در غلظت MIC بودند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه اثر تیمار جدایه های استرپتوکوکوس موتانس با تریکلوزان در تشکیل بیوفیلم

تیمار جدایه ها با تریکلوزان		غلظت MIC		غلظت Sub MIC	
تشکیل بیوفیلم جدایه ها بدون تیمار		فاقد بیوفیلم	بیوفیلم ضعیف	فاقد بیوفیلم	بیوفیلم ضعیف
بیوفیلم قوی (۳/۱۵٪)		۲ (۶۶/۷٪)	۱ (۳۳/۳٪)	۰ (۰٪)	۳ (۱۰۰٪)
بیوفیلم متوسط (۱۱/۵۵٪)		۱۰ (۹۰/۱٪)	۱ (۹/۱٪)	۰ (۰٪)	۱۱ (۱۰۰٪)
بیوفیلم ضعیف (۶/۳۰٪)		۶ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)	۱ (۱۶/۷٪)	۵ (۸۳/۳٪)
کل (۲۰/۱۰۰٪)		۱۸ (۹۰٪)	۲ (۱۰٪)	۱ (۵٪)	۱۹ (۹۵٪)

بحث

استرپتوکوک‌های موتانس شایع‌ترین باکتری‌هایی هستند که از نمونه‌های دندانی جدا می‌شوند و ارتباط نزدیکی با پوسیدگی دندان دارند و شیوع آن‌ها در بررسی‌های اپیدمیولوژیک گزارش شده است (۱۶). میزان بالای این باکتری‌ها، فرد را در گروه پرخطر قرار می‌دهد که این فراوانی در هر کشور و هر نژادی متفاوت است (۱۷). در تحقیق حاضر فراوانی سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس حدود ۱۵٪ تایید شد. در مطالعه قبلی محققین در ایران در سال ۱۳۹۷، فراوانی استرپتوکوک‌های ویریدانس در نمونه‌های دندانی کودکان دبستانی ۶۶/۷٪ گزارش شد (۱۱). مطالعات دیگر در سال ۲۰۰۲ در برزیل (۸۵/۷٪) (۱۸) و در سال ۲۰۱۵ در عراق (۷۱/۴٪) (۱۹) نیز با فراوانی بیشتری از مطالعه حاضر گزارش شد. نرخ کمتر در نتایج این مطالعه

می‌تواند ناشی از تغییر عوامل محیطی و فردی مانند رژیم غذایی، قرارگیری در معرض فلوراید، بهداشت دهان، جریان بزاق و عوامل ایمنی در نفاط مختلف یک کشور یا سطح دنیا باشد (۲۰).

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی مشکل پوسیدگی دندان در سراسر جهان به ویژه در گروه‌های محروم اجتماعی همچنان باقی مانده است. به گزارش این سازمان این معضل نه تنها در کودکان بلکه در بزرگسالان نیز بارز است. بنابراین با توجه به گزارشات گسترده مقاومت‌های دارویی، پیشگیری منطقی‌تر از درمان به نظر می‌رسد، که یکی از راه‌های کنترل آن جلوگیری از تشکیل بیوفیلم است (۱۱، ۲۰). در مطالعه حاضر ۸۷/۳٪ جدایه‌های استرپتوکوکوس موتانس قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. در مطالعه‌ای در ایران در سال ۲۰۱۳ بر روی کودکان ۴-۶ ساله، فراوانی بیوفیلم دندانی ناشی از



استرپتوکوکوس موتانس را حدود ۶۵ درصد اعلام کردند (۱۷) که کمتر از فراوانی بدست آمده در این مطالعه بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت رنج سنی و متنوع بودن واسطه‌های اتصالی چنین باکتری‌هایی باشد. کما اینکه برخی از محققین توانایی اگلوتنین بزاق را از طریق مکانیسم‌های وابسته به ادهزین P1 و مستقل از P1 در شکل‌گیری بیوفیلیم توسط استرپتوکوک‌های موتانس (۲۱) و برخی دیگر (۲۲) نقش پر رنگ سورتاز A را در تشکیل بیوفیلیم تایید کردند. که در هر حال ممانعت از این اتصال، روند فعالیت باکتری را متوقف خواهد کرد. در مطالعه حاضر بیش از ۸۰ درصد ایزوله واجد ژن *SrtA* بودند و در واقع توانایی تشکیل بیوفیلیم و اتصال به سطوح دندانی را داشتند. محققین در سال ۲۰۰۵، مشاهده کردند که غیرفعال‌سازی ژن *SrtA* موجب کاهش تشکیل بیوفیلیم می‌شود (۲۳). دیگر محققین تایید کردند که چسبندگی جهش یافته‌های *srtA* به سطوح دندانی به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۲۴). این مطالعات نشان می‌دهد که آنزیم سورتاز واسطه اتصال به دیواره سلولی در *استرپتوکوکوس موتانس* است. در این مطالعه نیز نقش پر رنگ این ژن در تشکیل بیوفیلیم تایید شد، بطوریکه از کل ۱۳ درصد جدایه فاقد ژن *srtA* همگی فاقد قدرت تولید بیوفیلیم بودند. در بررسی‌های آزمایشگاهی یکی از بهترین راهکارها جهت تعیین اثر ضد میکروبی و تعیین دوز موثر یک ترکیب تعیین حداقل غلظت مهاری آن است.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به عنوان کمترین غلظت از یک ترکیب که می‌تواند به میزان قابل توجهی رشد یک میکروارگانیسم را مهار نماید، در تعیین غلظت نهایی موثر داروها و مکمل‌های دارویی بسیار مطلوب است (۲۶).

محققین در سال ۲۰۱۴ غلظت‌های تریکلوزان تحت MIC را بر تشکیل بیوفیلیم *استرپتوکوکوس موتانس* تایید کردند لیکن در مطالعه ما صرفاً ۵ درصد جدایه‌ها در غلظت تحت MIC قادر به تشکیل بیوفیلیم نبودند و اغلب جدایه‌های مولد بیوفیلیم در غلظت MIC از بین رفتند (۲۶). پیشتر برخی محققین اعلام کردند مصرف کوتاه مدت تریکلوزان ممکن است نقش چندانی در حساسیت و عدم تشکیل بیوفیلیم نداشته باشد (۲۷). بنابراین به نظر می‌رسد علاوه بر غلظت این ترکیب، فاکتور زمان مواجهه باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* با تریکلوزان نیز در افزایش اثر ضد باکتریایی آن دخالت دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که بین حضور سورتاز A و پوسیدگی‌های دندانی ناشی از بیوفیلیم جدایه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* ارتباط معنی‌داری وجود دارد و تریکلوزان دارای خاصیت ضدباکتریایی قوی در سرکوب تشکیل بیوفیلیم این میکروفرور مطرح دهان است. با توجه به مطالعه حاضر و پیشین پیشنهاد می‌شود در تهیه تریکلوزان به عنوان مکمل دارویی علاوه بر تنظیم دوز موثر، زمان مصرف آن در فرمولاسیون و درنهایت در خط تولید لحاظ شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد است. نویسندگان مراتب تشکر خود را از تمام کسانی که در این پژوهش یاری کردند و همچنین پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد گرگان اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.



References

1. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003;1(3):219–30.
2. Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada S, Kawabata S. Role of streptococcus sanguinis sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect.* 2006; 8(12-13):2791–96.
3. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilm: an emergent form of bacterial life. *Nature Rev microbial.* 2016;14(9):563-75.
4. Morgan-Sagastume F, Larsen P, Nielsen JL, Nielsen PH. Characterization of the loosely attached fraction of activated sludge bacteria. *Water Res.* 2008; 42(4):843-54.
5. Schaudinn C, Gorur A, Keller D, Sedghizadeh PP, Costerton JW. Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(8):978-86.
6. Whiley R. Essential microbiology for dentistry. *Br Dent J.* 2006; 201(10):679.
7. Spirig T, Weiner EM, Clubb RT. Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 2011;82(5): 1044–59.
8. Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada S, Kawabata S. Role of streptococcus sanguinis sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect.* 2006; 8(12-13): 2791–96.
9. Lévesque C, Christian V, Michel F. The csp operon of *Streptococcus salivarius* encodes two predicted cell-surface proteins, one of which, CspB, is associated with the fimbriae". *Microbiol.* 2004; 150. 1: 189-98.
10. Thompson A, Griffin P, Stuetz R, Cartmell E. The Fate and Removal of Triclosan during Wastewater Treatment. *Water Environ Res.* 2005; 77 (1): 63–7.
11. Siahbalaii R, Fozouni L, Kiaei E. Antibacterial Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Drug Resistant Viridans Group Streptococci Isolated from Dental Samples of Pupils. *IICCOM.* 2018; 23(80):1-9.
12. Esfahanian V, Mohamadi F, Amini S. An In Vitro Comparison of Antimicrobial Effect of Nanosil and Chlorhexidine Mouthrinses. *J Islam Dent Assoc Iran.* 2012; 24 (4) :187-91.
13. Homonylo-McGavin M K and Lee S F. Role of the C terminus in antigen P1 surface localization in *Streptococcus mutans* and two related cocci. *J. Bacteriol.* 1996. 178:801–7.
14. Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):441-54.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial 324 susceptibility testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25. 325. Clinical and Laboratory Standards Institute 2015; Wayne, PA, USA
16. Yoo SY, Park SJ, Jeong DK, Kim KW, Lim SH, Lee SH, et al. Isolation and Characterization of the mutans Streptococci from the Dental Plaques in Koreans. *Journal Microbiol.* 2007; 45(3): 246-55.
17. Moulana Z, Ghasem Pour M, Asghar Pour F, Elmi MM, Baghban Shaker P. The Frequency of Streptococcus Mutans and Lactobacillus spp. in 3-5-year-old Children with and without Dental Caries. *mljgoums.* 2013; 7(1) :29-34.
18. Teresa Cristina Costa F, Patrícia A, José Moacir M, Fernando Antonio de Á. Detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in Dental Plaque Samples from Brazilian Preschool Children by Polymerase Chain Reaction. *Braz Dent J.* 2007; 18(4): 329-33.



19. Hani Hassan Jubair. The Relationship Between Biofilm Forming and Antibiotics Resistance of *Streptococcus mutans* Isolated from Dental Caries. *Int. Journal Curr. Microbiol.App. Sci.* 2015; 4(5): 568-74.
20. Zukanović A, Muratbegović A, Kobaslija S, Marković N, Ganibegović M, Beslagić E. Relationships between socioeconomic backgrounds, caries associated microflora and caries experience in 12-year-olds in Bosnia and Herzegovina in 2004. *Eur J Paediatr Dent.* 2008; 9(3): 118-24.
21. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004; 32(5):319-21.
22. Sug-Joon Ahn, Sang-Joon Ahn, Zezhang T. Wen, L. Jeannine Brady, and Robert A. Burne. Characteristics of Biofilm Formation by *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliv. *Infect Immun* 2008; 76(9): 4259–68.
23. Céline M, Le´vesque, Elena Voronejskaia, Yi-Chen Cathy Huang, Richard W, Mair and et al. Involvement of Sortase Anchoring of Cell Wall Proteins in Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2005; 73(6): 3773-77.
24. Igarashi T, E. Asaga and N. Goto. Roles of *Streptococcus mutans* dextranase anchored to the cell wall by sortase. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004; 19:102-5.
25. Gavaric N, Mozina SS, Kladar N, Bozin B. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *J. Essent.Oil-Bear.Plants.* 2015; 18(4):1013-21.
26. Blanca Lombardo Bedran T, Grignon L, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. *PLoS One.* 2014; 13(9(2): e89059
27. Sullivan AE, Wretlind B and Nord CE. Will triclosan in toothpaste select for resistant oral streptococci? *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:306-9.



The Anti-Biofilm Role of Triclosan on the Activity of Streptococcal Isolates containing Sortase A in Control of Dental Caries

Fatemeh Hejazinia, Leila Fozouni*

Department of Biology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.

Original Article

Received: 1 Jan 2021

Accepted: 19 May 2021

*Corresponding Author:

Dr. Leila Fozouni,
Department of Biology,
Gorgan Branch, Islamic Azad
University

TEL: +989111518674

Email:

lili_kia@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction

One of the most common childhood problems is tooth decay and *Streptococcus mutans* is the most common bacterium that causes the infection. The purpose of the study was to investigate the effect of triclosan on biofilm formation due to streptococcal sortase A enzyme activity in the control of dental caries.

Materials and Methods

In this experimental study, 150 samples were taken from the buccal and lingual surfaces of posterior teeth of pupils in Gorgan in 2019. *S. mutans* strains were identified using conventional microbiological and biochemical tests. The *SrtA* gene was identified using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The minimum inhibitory concentration (MIC) of triclosan against the isolates was determined by the broth microdilution method. Biofilm formation and antibiofilm effect of triclosan were assessed using the modified microtiter plate assay.

Results

The frequency of *S. mutans* was 15.3%, of which, 87% were capable of biofilm production. 19 isolates (82.6%) with the *srtA* gene were identified. The concentration of triclosan, that inhibited 50% growth of isolates (MIC₅₀) was 8 µg /ml, which was 8-fold less than the concentration required to inhibit the growth of 90% of isolates (MIC₉₀=64 µg/ml), so that 90% of the isolates lacked the ability to form biofilms at MIC concentration (P<0.05).

Conclusion

The results showed that there is a relationship between the presence of sortase A and the formation of bacterial biofilm and triclosan showed a good anti-biofilm effect in vitro condition.

Keywords

Streptococcus mutans, Sortase A, Triclosan, Antibiofilm effect

► **Please cite this article as:** Hejazinia F, Fozouni L. The Anti-Biofilm Role of Triclosan on the Activity of Streptococcal Isolates containing Sortase A in Control of Dental Caries. J Neyshabur Univ Med Sci 2021;9(3):97-106.