مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۵۶/هفته چهارم آذر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۲۴

تعیین هویت استرپتوکوک موتانس جدا شده از پلاک دندانی بر اساس وجود ژن gtfB

شهزاد رحماندوست[۱]، دکتر کیومرث امینی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استرپتوکوک‌های دهانی، به ویژه استرپتوکوکوس موتانس، از عوامل مؤثر در ایجاد پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال شناخته شده‌اند. ژن گلوکوزیل ترانسفراز (gtfB) توسط GTF-I (Glucosyltransferase-I) کد می‌شود و از عوامل مهم حدت این باکتری می‌باشد. در حال حاضر، با توسعه روش‌های مولکولی، امکان شناسایی استرپتوکوکوس موتانس با دقت و سرعت بالا وجود دارد. هدف این مطالعه، شناسایی استرپتوکوکوس موتانس از منابع پلاک دندانی انسان بر اساس وجود ژن gtfB بود.

روش‌ها: پس از جمع آوری ۵۵ نمونه سوآپ از پلاک دندانی، آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی و میکروبی انجام شد. DNA نمونه‌های تأیید شده، با کیت استخراج گردید و سپس جهت شناسایی ژن gtfB، آزمون PCR (Polymerase chain reaction) بر روی نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها: از بین ۵۵ نمونه‌ی جدا شده از پلاک‌های دندانی، ۱۷ نمونه(۳۰/۹ درصد) از نظر وجود ژن gtfB مثبت بود.

نتیجه‌گیری: با بررسی نتایج به دست آمده با روش PCR در این مطالعه، مشخص گردید که تفاوت‌هایی با تحقیقات صورت گرفته در سایر کشورها و مناطق ایران وجود دارد. این اختلافات به علت تفاوت‌های فرهنگی در استفاده از مسواک و نخ دندان، نوع رژیم غذایی و وضعیت بهداشت دهان و دندان می‌باشد.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس موتانس، گلوکوزیل ترانسفراز، ژن gtfB

ارجاع: رحماندوست شهزاد، امینی کیومرث. **تعیین هویت استرپتوکوک موتانس جدا شده از پلاک دندانی بر اساس وجود ژن gtfB.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۵۶): ۱۸۰۹-۱۸۰۴

مقدمه

استرپتوکوک‌ها گروه بزرگی از کوکسی‌های گرم مثبت هستند که به شکل دوتایی یا زنجیره‌وار رشد می‌کنند (۱). استرپتوکوک موتانس، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که فلور حفره‌ی دهانی در انسان می‌باشد (۳-۲). این باکتری، مهم‌ترین عامل پوسیدگی و کرم خوردگی دندان است (۴). عدم تعادل بین میکروفلور دهانی، موجب پیدایش بیماری‌های دهان و دندان می‌شود (۵-۴).

استرپتوکوک موتانس با تخمیر سوکروز و تولید اسید لاکتیک، موجب تأثیر بر مینای دندان می‌شود. همچنین، این باکتری از سوکروز برای ساخت پلاک دندانی استفاده می‌کند (۶). پلاک دندانی از دکستران که نوعی پلی‌ساکارید است، ساخته می‌شود (۷). رعایت بهداشت دهان و استفاده از مسواک، از رشد باکتری، تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان‌ها جلوگیری می‌کند. تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی از ساکاروز به چسبیدن ارگانیسم‌های تشکیل دهنده‌ی

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر کیومرث امینی
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

پلاک به همدیگر و به سطح دندان کمک می‌کند (۸). دلیل پوسیدگی سطحی، تأثیر فراورده‌های اسیدی حاصل از تخمیر باکتری‌ها است و به دنبال هضم ماده‌ی زمینه‌ی پروتئینی (ماتریکس) توسط باکتری‌ها که موجب تجزیه‌ی عاج دندان می‌گردد.

استرپتوکوکوس موتانس سه نوع گلوکوزیل ترانسفراز (Glucosyltransferase) (GTF-I، GTF-SI و GTF-S) تولید می‌کند که ژن گلوکوزیل ترانسفراز (gtfB) توسط GTF-I کد می‌شود، در مراحل ابتدایی سنتز گلوکان از سوکروز دخالت دارد و غیر قابل حل در آب است. این ژن، از عوامل مهم حدت این باکتری می‌باشد (۱۰-۹). 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 (۱۲-۱۱). هدف از این مطالعه، شناسایی ژن gtfB استرپتوکوکوس موتانس از منابع پلاک دندانی انسان با روش PCR (Polymerase chain reaction) بود.

روش‌ها

تعداد ۵۵ نمونه‌ی سوآپ از پلاک دندانی افرادی که طی مدت ۳ ماه به مراکز دندانپزشکی تهران مراجعه کردند، جمع‌آوری شد. سپس، سوآپ‌ها در محیط نگهدارنده‌ی تایوگلیکولات قرار گرفت و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. برای جداسازی استرپتوکوکوس موتانس، از محیط کشت Blood agar استفاده شد و نمونه‌ها بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. به منظور تأیید کلنی‌های مشکوک به استرپتوکوک موتانس، از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام میکروسکوپی تهیه و رنگ‌آمیزی گرم (Gram staining) انجام شد. با مشاهده‌ی کوکسی‌های گرم مثبت، آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، هالوز، لاکتوز و مانیتول بر روی سویه‌های جدا شده انجام و باکتری تعیین هویت گردید. آزمون‌های مانیتول، لاکتوز، سالیسین و ترهالوز استرپتوکوکوس موتانس مثبت بودند، اما آزمون‌های مانوز، کاتالاز، اکسیداز و اوره‌آز باکتری منفی بودند (۱۴-۱۳).

جهت استخراج DNA از کیت باکتری‌های گرم مثبت سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881614) استفاده گردید.

برنامه‌ی آزمون PCR: مرحله‌ی دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله‌ی دناتوراسیون ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله‌ی بسط ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه (تعداد ۴۰ چرخه) و مرحله‌ی بسط نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون، در جدول ۱ آمده است (۱۵).

جهت انجام واکنش، آب مقطر ۷ میکرولیتر، PCR Master Mix به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده هر کدام ۱/۵ میکرولیتر و نمونه‌ی DNA ۲/۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید (۱۵). آزمون PCR در دستگاه TECHNE انجام شد. جهت بررسی محصول PCR، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال یافتند و بعد از رنگ‌آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD

مورد بررسی قرار گرفتند.

داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون آماری t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

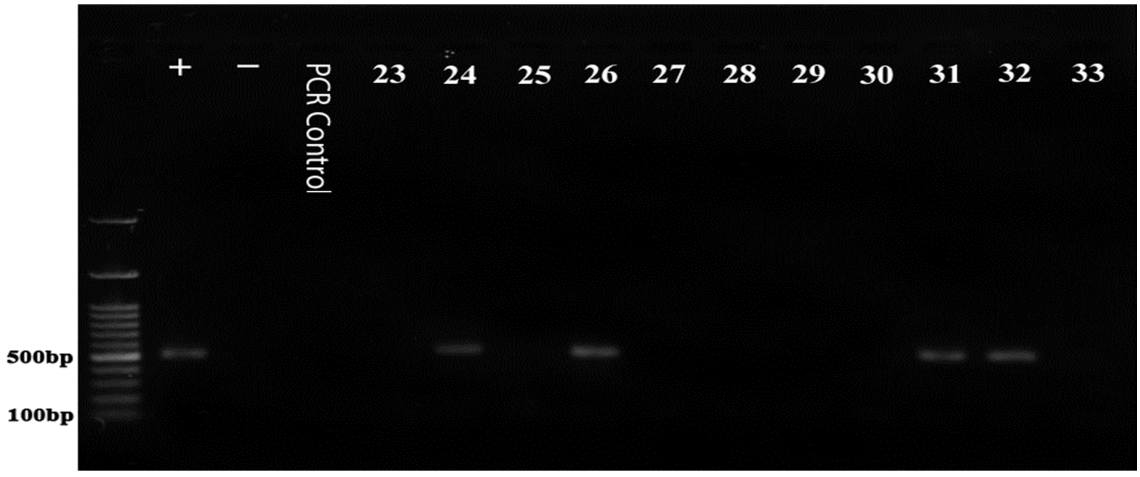
این تحقیق بر روی ۵۵ نمونه از پلاک‌های دندانی جمع‌آوری شده انجام گرفت. بر اساس نتیجه‌ی آزمایش PCR، جهت شناسایی ژن gtfB مشخص گردید که از ۵۵ ایزوله‌ی مورد مطالعه، تنها ۱۷ جدایه (۳۰/۹ درصد) واجد ژن gtfB بودند. شکل ۱، نتیجه‌ی آزمون PCR نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن gtfB را نشان می‌دهد.

بحث

انجام خدمات دندانپزشکی، مسواک نزدن یا جویدن شدید دندان و استفاده از خلال دندان به منظور تمیز کردن آن، می‌تواند عامل ایجاد باکتریمی گذرا ناشی از استرپتوکوک موتانس گردد. استرپتوکوک‌های دهانی به ویژه استرپتوکوکوس موتانس، از عوامل مؤثر در ایجاد پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال شناخته شده‌اند (۱۶). بر اساس گزارش‌های به دست آمده، پوسیدگی‌های دندانی در ۹۵ درصد افراد جامعه وجود دارد (۱۷). در پوسیدگی دندان، مهم‌ترین عامل، اتصال استرپتوکوکوس موتانس به سطوح مختلف دهان و دندان می‌باشد. روش‌های متداول جداسازی استرپتوکوکوس موتانس، امری پرزحمت است؛ از این رو، امروزه بر استفاده از روش‌های سریع و حساس تأکید می‌شود. در حال حاضر، توسعه‌ی روش‌های مولکولی این امکان را فراهم می‌سازد که با دقت و سرعت بالا، باکتری مورد نظر شناسایی شود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده (۱۵)

پرایمر	ژن	توالی پرایمر (5’ to 3’)	طول باند محصول
Oho	gtfB	ACT ACA CTT TCG GGT GGC TTG G CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C	bp۵۱۷



شکل ۱. نتایج Polymearase chain reaction (PCR)

از سمت چپ: نشانگر bp ۱۰۰، شاهد مثبت، شاهد منفی، نمونه‌های ۲۴، ۲۶، ۳۱ و ۳۲ از نظر وجود ژن gtfB با طول باند bp ۵۱۷ مثبت می‌باشند.

در ایـن تحقیـق، از روش PCR و ژن gtfB جهـت تعیـین هویـت اسـترپتوکوکوس موتـانس اسـتفاده شـد. Lembo و همکاران به بررسی ژنـوتیپی اسـترپتوکوکوس موتـانس جـدا شـده از پـلاک دنـدانی کودکـان دارای پوسیدگی فعـال و فاقـد پوسـیدگی بـه روش AP-PCR (Arbitrarily primed polymerase chain reaction) پرداختند. ژنوتیپ‌های با مقاومت اسیدی کمتر، بیشـتر در نمونه‌های دهانی دارای پوسـیدگی فعـال مشـاهده شـد کـه نشـان از تفـاوت در توزیـع ژنوتیـپ‌هـای اسـترپتوکوک موتـانس بـر اسـاس موقعیـت دهـانی می‌باشد (۱۷).

سـلطان دلال و همکـاران بـا بررسـی نقـش اسـترپتوکوکوس موتـانس بـه عنـوان پـاتوژن اصـلی پوسیدگی در کودکان ۵-۳ سال حسـاس و مقـاوم بـه پوسـیدگی دنـدان دریافتنـد کـه میـزان جداسـازی استرپتوکوکوس موتانس با سـن بیمـار و میـزان مصـرف مواد قندی به طور کامل مرتبط است و موجـب افـزایش ابتلا به این باکتری و کلونیزاسیون آن می‌گردد (۱۶).

صـالحی و همکـاران بـا جسـتجوی ژن‌هـای موتاسین در استرپتوکوکوس موتانس ایزوله شـده از بیماران ایرانی و با اسـتفاده از روش PCR دریافتنـد کـه شـاید موتاسـین‌هـای اسـترپتوکوکوس موتـانس دارای خاصیت آنتاگونیسـتی در مقابـل رشـد دیگـر باکتری‌ها می‌باشند (۱۲).

قاسم‌پور و همکاران با بررسـی بـر روی کودکـان ۶-۴ ساله، اعلام نمودند کـه فراوانـی بیـوفیلم پـلاک دندانی تشکیل شده توسط اسـترپتوکوکوس موتـانس، به مراتب بیشتر از استرپتوکوک سـوبرینوس بـود (در حدود ۶۵ درصـد) و در کودکـان ناقـل ۷۵/۶ درصـد جداسازی شد (۱۸).

در تحقیق طهمورث‌پور و همکاران که به بررسـی اتصال استرپتوکوک‌های دهانی در شـرایط آزمایشـگاه پرداختند، مشخص گردیـد کـه اتصـال، مهـم‌تـرین و اولین عامل در ایجاد پوسیدگی و بیماری دندان اسـت و کاهش اتصال، می‌تواند راه مؤثری در کـاهش خطـر پوسیدگی دندان باشد (۷). بررسی‌ها نشان می‌دهد که این ژن از نظر انتشار عوامـل حـدت و ایجـاد پـلاک، دارای فراوانی‌های متفاوت می‌باشد. در این پـژوهش، از ۵۵ نمونه‌ی جدا شده از پلاک‌های دندانی، تنهـا ۱۷ (۳۰/۹ درصـد) نمونـه از نظـر وجـود ژن gtfB مثبت بودند.

نتایج به دست آمده به روش PCR در این مطالعـه بـا مطالعـات محققـین دیگـر در نقـاط مختلـف دنیـا تفاوت‌هایی دارد که این اختلافـات ممکـن اسـت بـه علت تفاوت‌های فرهنگی در استفاده از مسواک و نـخ دندان، نوع رژیم غذایی و وضعیت بهداشـت دهـان و دندان باشد (۱۶).

در ایران، مطالعات زیادی برای شناسـایی مولکـولی ژن حدت gtfB در باکتری استرپتوکوکوس موتانس بـا استفاده از PCR صـورت نگرفتـه اسـت. از ایـن رو در مطالعـه‌ی حاضـر، بـه نقـش ژن gtfB در ایجـاد پوسـیدگی‌هـای دنـدانی اشـاره شـده اسـت. عوامـل تأثیرگـذار بـر میـزان جداسـازی ایـن بـاکتری شـامل برداشـتن فیزیکـی پـلاک (جـرم‌گیـری)، محـدودیت مصرف ساکارز (منظور از ساکارز، قند معمولی و شـکر پودری است)، تغذیـه‌ی خـوب دارای پـروتئین کـافی، کاهش تولید اسـید در دهـان از طریـق محـدود کـردن کربوهیدرات‌های در دسـترس، تمیـز کـردن مکـرر بـا مسواک و نخ دندان، به کار بردن فلوراید برای دندان‌هـا (جهت افزایش مقاومت مینا در برابر اسید) می‌باشند.

پیشنهاد می‌گردد که بررسی مواد ضد میکروبی بر ماده‌ی بیوفیلم متشکل از انواع استرپتوکوک‌های دهانی به منظور کاهش پوسیدگی و پروفایل آنتی‌بیوتیکی این باکتری، هر ساله انجام شود تا شیوه‌های درمانی مناسب ارایه گردد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد مهندس ابوالفضل مقدم، مهندس رامین خاکی جوان و آقای دکتر علیرضا مختاری که در انجام مراحل عملی این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York, NY: Springer; 2005.
2. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of medical microbiology. New York, NY: Appleton and Lange; 1998. p. 212-4.
3. Balakrishnan M, Simmonds RS, Kilian M, Tagg JR. Different bacteriocin activities of Streptococcus mutans reflect distinct phylogenetic lineages. J Med Microbiol 2002; 51(11): 941-8.
4. Hillman JD, Dzuback AL, Andrews SW. Colonization of the human oral cavity by a Streptococcus mutans mutant producing increased bacteriocin. J Dent Res 1987; 66(6): 1092-4.
5. Ono T, Hirota K, Nemoto K, Fernandez EJ, Ota F, Fukui K. Detection of Streptococcus mutans by PCR amplification of spaP gene. J Med Microbiol 1994; 41(4): 231-5.
6. Qi F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of Streptococcus mutans, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol 2001; 67(1): 15-21.
7. Tahmourespour A, Kermanshahi RK, Salehi R, Ghasemi Pero N. Biofilm formation potential of oral streptococci in related to some carbohydrate substrates. Afr J Microbiol Res 2010; 4(11): 1051-6.
8. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Hofling JF, Mattos-Graner R, et al. Genotypic diversity and virulence traits of Streptococcus mutans in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 7): 697-703.
9. Yoshida A, Kuramitsu HK. Streptococcus mutans biofilm formation: utilization of a gtfB promoter-green fluorescent protein (PgtfB::gfp) construct to monitor development. Microbiology 2002; 148(Pt 11): 3385-94.
10. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N. Real-time PCR for quantification of Streptococcus mutans. FEMS Microbiol Lett 2002; 217(1): 23-30.
11. Kamiya RU, Napimoga MH, Hofling JF, Goncalves RB. Frequency of four different mutacin genes in Streptococcus mutans genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 6): 599-604.
12. Salehi M, Moradi S, Aghili T, Razavipor R. Exploration of mutacin genes I/III and II in Streptococcus mutans isolated from Iranian patients. Med Sci J Islamic Azad Univ Tehran Med Branch 2011; 21(2): 89-96. [In Persian].
13. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 2002; 15(4): 613-30.
14. Novak J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from Streptococcus mutans. J Bacteriol 1994; 176(14): 4316-20.
15. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiyama M, Koga T. Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 2000; 15(4): 258-62.
16. Soltan Dallal MM, Dargahi H, Mehrani F, Sharifi Yazdi MK, Rahimi Forushani A, Miremadi A. The role Of streptococcus mutants In dental caries in two groups of sensitive and resistance children age between 3 to 5 tears. Payavard Salamat 2013; 6(6): 467-77. [In Persian].
17. Lembo FL, Longo PL, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues CR, Mayer MP. Genotypic and phenotypic analysis of Streptococcus mutans from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. Oral Microbiol Immunol 2007; 22(5): 313-9.
18. Ghasempour M, Rajabnia R, Irannejad A, Hamzeh M, Ferdosi E, Bagheri M. Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in saliva of preschool children with different levels of caries activity. Dent Res J (Isfahan) 2013; 10(4): 440-5.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 07.09.2015
Vol. 33, No. 356, 4th Week, December 2015
Accepted: 15.11.2015

Identification of Streptococcus Mutans Isolated from Dental Plaques Based on the Presence of gtfB Gene

Shahzad Rahmandoost MSc[1], Kumarss Amini PhD[2]

Original Article

Abstract

Background: Oral streptococci, especially Streptococcus mutans, are of the factors identified to cause tooth decay and periodontal disease. Glucosyltransferase gene (gtfB) encoded by the GTF-I is an important factor in the virulence of the bacteria. Now, the development of molecular methods tends to detect Streptococcus mutans with accuracy and speed. This study aimed to identify Streptococcus mutans in human dental plaques based on the presence of gtfB gene.

Methods: After collecting 55 swab samples of dental plaques, biochemical and microbiological tests were performed. DNA samples were confirmed using the extraction kit and then, the polymerase chain reaction (PCR) assay was performed on samples to identify the gtfB gene.

Findings: Of 55 isolates collected from dental plaques, 17 samples (30.9%) were positive for the presence of gtfB gene.

Conclusion: The results obtained in this study found to have differences with other researches conducted in other countries and regions of Iran. These differences may be due to cultural differences in the use of toothbrush and dental floss, diet and oral health status.

Keywords: Streptococcus mutans, Glucosyltransferase, gtfB gene

Citation: Rahmandoost Sh, Amini K. **Identification of Streptococcus Mutans Isolated from Dental Plaques Based on the Presence of gtfB Gene.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(356): 1804-9

1- Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran
Corresponding Author: Kumarss Amini PhD, Email: kamini@iau-saveh.ac.ir