مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۲، تابستان ۹۰، صفحات ۸۹ تا ۹۶

Original Article

جستجوی ژن‌های موتاسین II و I/ III در استرپتوکوکوس موتانس‌های ایزوله شده از بیماران ایرانی

میترا صالحی[۱]، سهیلا مرادی[۲]، طاهره عقیلی[۳]، رویا رضوی‌پور[۴]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۲] استادیار پژوهشی، بخش میکروبیولوژی انسیتو رازی، کرج
[۳] دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۴] کارشناس میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: *استرپتوکوکوس موتانس که در فضای دهانی وجود دارد، قادر به تولید باکتریوسین با خاصیت آنتی‌بیوتیکی است. این باکتریوسین‌ها در استرپتوکوکوس موتانس، موتاسین نام دارند. هدف از این مطالعه، جستجوی خاصیت آنتاگونیستی استرپتوکوک‌های موتانس ایزوله شده از دهان بیماران ایرانی بود.*

روش بررسی: *فعالیت آنتی‌میکروبیال موتاسین‌ها در مقابل استرپتوکوکوس موتانس با ATCC35668 با روش چاهک‌گذاری و دیسک گذاری ارزیابی گردید. همچنین در ۶۷/۲ درصد موارد ژن‌های کد کننده موتاسین تیپ II و I/ III با روش PCR تعیین شدند.*

یافته‌ها: *در کل، از ۳۲ نمونه استرپتوکوکوس موتانس ایزوله شده از دهان بیماران ایرانی، ۲۵ سویه خاصیت آنتی‌میکروبیال موتاسین‌های خود را نشان دادند و ژنوتایپ مثبت موتاسین‌های تیپ ۱، ۲ و ۳ این سویه‌ها با روش PCR تعیین شد.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد موتاسین‌های استرپتوکوکوس‌های موتانس احتمالا دارای خاصیت آنتاگونیستی در مقابل رشد دیگر باکتری‌ها می باشند. استخراج این ترکیبات (موتاسین‌ها) می‌تواند به عنوان یک داروی آنتی‌باکتریال مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: *آنتی‌میکروبیال، موتاسین، استرپتوکوکوس موتانس.*

مقدمه

باکتریوسین‌ها ترکیبات پپتیدی حاصل از متابولیسم برخی از باکتری‌ها می باشند که با قدرت آنتاگونیستی مانع رشد میکروارگانیسم‌های دیگر می‌شوند (۲،۱). باکتریوسین‌ها از نظر نحوه عملکرد، وزن مولکولی، منشاء ژنتیکی و خصوصیات بیوشیمیایی متنوعند. از این رو، تحقیقات متعددی جهت شناسایی سویه‌های مولد باکتریوسین و ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی آنها در دست انجام است. امروزه تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های لاکتیک از جمله لاکتوکوکوس، لاکتوباسیل و انتروکوک‌ها گزارش شده است (۳). استرپتوکوک‌های حفره دهانی که بیشترین تاثیر را در ایجاد پوسیدگی و تشکیل پلاک دندانی دارند، در گروه آلفاهمولیتیک ویریدانس قرار می‌گیرند. استرپتوکوکوس موتانس یکی از استرپتوکوک‌های دهانی می‌باشد که حضور ۳۰ درصدی آن در قسمت‌های مختلف حفره دهان از جمله اپیتلیوم زبان، سطح جونده دندان‌ها، سطوح مجاور دندان‌ها و شیار لثه گزارش شده است (۴). استرپتوکوکوس موتانس قادر به تولید بیشترین مقدار باکتریوسین به نام موتاسین است که خاصیت آنتی‌بیوتیکی دارد (۵). موتاسین‌های استرپتوکوکوس موتانس، ترکیبات پپتیدی هستند که عمدتا برای باکتری‌های

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، مجتمع آزمایشگاهی، طاهره عقیلی (email: Shirin.Aghili.mi@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۲۸

دیگر، حتی گونه‌های مرتبط یا نزدیک به هم، خاصیت باکتریوسیدی دارند (۵).

موتاسین‌ها را بر اساس خاصیت ضد میکروبی آنها به چهار کلاس موتاسین II، I/III و IV طبقه‌بندی می‌کنند (۶). طیف ضدمیکروبی موتاسین IV بر روی اعضای گروه استرپتوکوکوس میتیس (*S. mitis*) موثر است، در حالی که موتاسین‌های II و III /Iطیف باکتریوسیدی گسترده‌تری دارند (۶). موتاسین در پایداری استرپتوکوکوس موتانس نسبت به باکتری‌های دیگر و تشکیل بیوفیلم که منجر به تخریب مینای دندان می‌شود، اهمیت دارد (۷). به طوری که در پوسیدگی‌های فعال، تولید میزان بالایی از فاکتورهای ویرولانس به خصوص موتاسین به وسیله سویه‌های مختلف استرپتوکوکوس موتانس گزارش شده است (۶).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی استرپتوکوکوس موتانس از افراد داوطلب، مشاهده خاصیت ضدمیکروبی ایزوله‌ها و بررسی ارتباط ژن‌های کدکننده موتاسین با توان آنتاگونیستی بود.

مواد و روشها

تعداد ۸۵ عدد سوآپ از حفره دهانی شامل ۳۰ عدد از پوسیدگی دندان، ۱۰ عدد از نوک زبان و ۱۸ عدد نمونه از شیار لثه‌ای افرادی که در طی مدت ۳ ماه به مراکز دندان پزشکی مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. سوآپ‌ها در محیط نگهدارنده تایوگلیکولات (شرکت مرک) قرار گرفته و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

برای جدا سازی استرپتوکوکوس موتانس، از محیطهای کشت بلاد آگار و BHI براث و BHI آگار و محیط استرپتوکوکوس سلکتیو آگار استفاده شد. محیطها طبق دستورشرکت تولید کننده آماده و توسط اتوکلاو سترون شدند (مرک، آلمان). نمونه‌ها بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماخانه گذاری شدند. به منظور تایید کلنی‌های مشکوک به استرپتوکوک، از کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط استرپتوکوکوس سلکتیو آگار، کشت خالص تهیه شد و مورد مطالعه میکروسکوپی و ماکروسکوپی قرار گرفتند. با استفاده از روش رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تخمیر قندهای مانوز، سوربیتول، سالیسین، هالوز، لاکتوز و مانیتول سویه‌های جدا شده تعیین هویت شدند (۸).

سویه اندیکاتور مورد استفاده در این تحقیق، استرپتوکوکوس موتانس ATCC ۳۵۶۶۸ بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری نشانگر، ابتدا در محیط مایع BHI و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت احیا شد. سپس در محیط‌های اختصاصی کشت داده شد و تحت آزمون‌های بیو شیمیایی قرار گرفت. از سویه استاندارد، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$) آماده شد.

سنجش اثر باکتریوسین تولید شده (موتاسین) از ایزوله‌های استرپتوکوکوس موتانس، با استفاده از روش چاهک‌گذاری (Agar well diffusion) و دیسک‌گذاری (Disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت (۹،۱۰).

برای این منظور، ابتدا کلنی‌هایی که به عنوان استرپتوکوکوس موتانس جداسازی و شناسایی شده بودند، به محیط BHI مایع تلقیح و به مدت حداقل ۲۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماخانه گذاری شدند. پس از رشد کافی، محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ (حاوی موتاسین) جهت بررسی توان آنتاگونیستی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که باکتری اندیکاتور با کدورت ۰/۵ مک فارلند به صورت سطحی کشت داده شد. در روش چاهک‌گذاری، ابتدا توسط پیپت پاستور چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط BHI آگار حفر شدند. از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به میزان ۳۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌ها ریخته و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

در روش دیسک‌گذاری، از محلول رویی به داخل لوله آزمایش استریل دیگری وارد شد و سپس دیسک‌های کاغذی به مدت ۱۲۰ دقیقه در این لوله ها قرار داده شد. دیسک‌ها بعد از خشک شدن با رعایت فاصله مناسب بر روی محیط BHI آگار حاوی باکتری قرار گرفتند. برای کنترل مثبت از دیسک ونکومایسین ۳۰ میکروگرمی و به عنوان کنترل منفی از سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. پلیت‌ها پس از گرمخانه گذاری، از لحاظ توانایی هر ایزوله در جلوگیری از رشد باکتری نشانگر و تشکیل هاله عدم رشد، مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفتند. جهت ارزیابی عیار موتاسین، ابتدا رقیق سازی در محیط مایع انجام شد. برای این منظور، یک میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ محیط کشت باکتری، به یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث افزوده و بدین ترتیب لوله‌های متوالی با دو برابر رقت تهیه شدند و میزان فعالیت هر رقت نسبت به باکتری نشانگر با روش چاهک‌گذاری تعیین و به عنوان تیتر و با AU/ml2 (Arbitrary unit per ml)گزارش شد (۱۱).

استخراج DNA ژنومیک از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط استرپتوکوکوس سلکتیو آگار با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت metabion انجام شد. DNAهای استخراج شده، توسط دستگاه ژل الکتروفورز ارزیابی کیفی و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۲۰ ارزیابی کمی شدند. بررسی مولکولی ایزوله‌های استرپتوکوکوس موتانس مبنی بر حضور ژن‌های مولد موتاسین، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (۶) هر ژن به روش PCR انجام شد. دلیل انتخاب پرایمرها در این تحقیق حساسیت بالای آنها نسبت به دیگر پرایمرهای طراحی شده است که در مقالات معتبر مرتبا به پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق ارجاع می‌شود (۶). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نمایش داده شده است.

جدول ۱- مشخصات پرایمرها

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه باند
mut II	Forward-'۵AACGCAGTAGTTTCTTTGAA-3'	444 bp
	Reverse 5'-TTCCGGTAAGTACATAGTGC-3'	
mut I/III	Forward -'۵AGTTTCAATAGTTACTGTTGC-3	450/700 bp
	Reverse 5'-GCCAAACGGAGTTGATCTCGT-3'	

برای انجام واکنش PCR، هر یک از پرایمرها با غلظت ۲ پیکومول به ازای هر میکرولیتر، در مخلوط واکنش با توجه مقادیر جدول ۲ مورد استفاده قرار گرفتند. حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برنامه زمان بندی دستگاه جهت تکثیر قطعات ژنی شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پلیمراسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه بود. مراحل PCR با پلیمراسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه پایان پذیرفت. در برنامه زمانی ژن mutII، اتصال پرایمرها در دمای ۵۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت (جدول ۳).

جدول ۲- مقادیر ترکیبات مورد استفاده در واکنش PCR (۶).

مواد	مقدار
dNTP	۱ماکرولیتر
Taq پلی مراز	۰/۲ ماکرولیتر
پرایمر forward	۱ ماکرولیتر
پرایمر reverse	۱ ماکرولیتر
Compllet Buffer	۲/۵ ماکرولیتر
Template	۱ ماکرولیتر
یک واکنش ۲۵ Reaction	

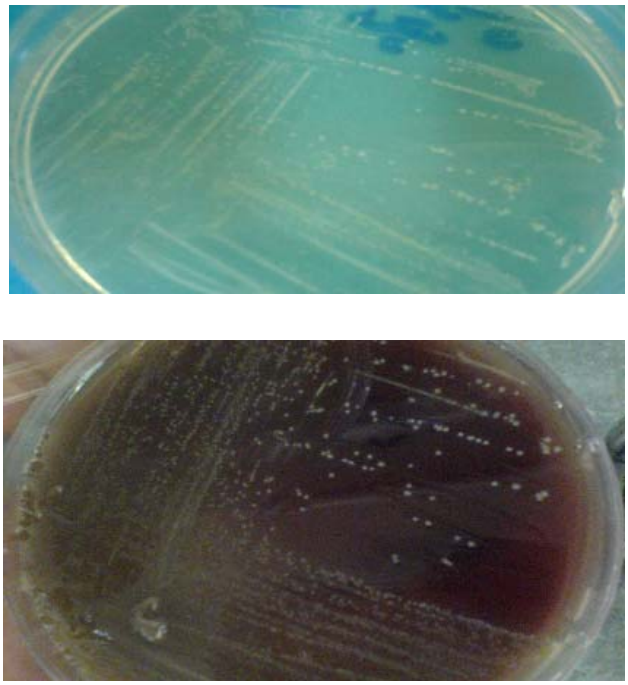
مقدار ۶ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. برای آشکارسازی باندهای تکثیر شده، ابتدا ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه ترانس لومیناتور UV قرار گرفت. جهت تعیین اندازه و سایز باندها از مارکر وزن مولکولی ۱۰۰bp DNA شرکت metabion دارای ۱۱ باند (از ۱۰۰ تا ۱۵۰۰) استفاده شد.

جدول ۳- برنامه PCR جهت تعیین حضور ژن موتاسین (۶).

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان
Denaturation – Pre	۹۴	۵ دقیقه
Denaturation	۹۴	۴۵ثانیه
Annealing	۵۴	۱ دقیقه
Extention	۷۲	۲دقیقه
Repeat	۳۵	-
Final Extention	۷۲	۷دقیقه
Final hold	۴	-

یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت ۸۵ نمونه بر روی محیطهای کشت انتخابی و اختصاصی نشان داد که در مجموع ۵۶ عدد از کل نمونه‌ها، از نظر استرپتوکوک مثبت بودند (شکل ۱).



شکل ۱- رشد باکتری در محیطهای محیط بلاد آگار و استرپتوکوکوس سلکتیو آگار

جهت تعیین هویت نهایی گونه موتانس، کلنی های حاصل از کشت خالص از طریق آزمون‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی طبق جدول ۴ مورد بررسی قرار گرفتند که در نهایت ۳۲ تعداد از کل ایزوله‌ها (۳۷/۶۴ درصد) استرپتوکوکوس موتانس شناسایی شدند.

جدول ۴- تعیین گونه استرپتوکوکوس موتانس

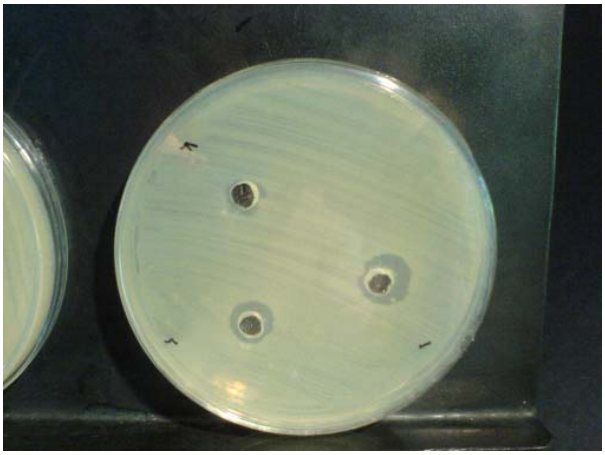
	استرپتوکوک موتانس
مانیتول	+
لاکتوز	+
سالیسین	+
تره هالوز	+
مانوز	-
کاتالاز	-
اکسیداز	-
اوره آز	-

جدول ۵- نتایج بررسی مولکولی به روش PCR و اثر آنتاگونیستی به روش چاهک‌گذاری ایزوله‌های استرپتوکوکوس موتانس

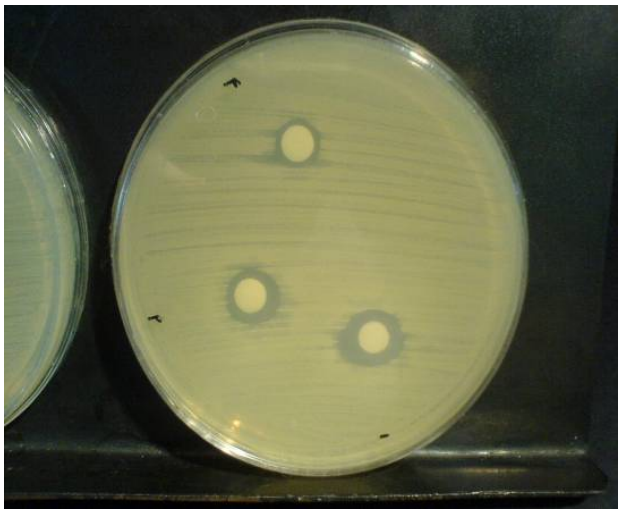
ایزوله ها	Mut II	Mut I/III	میانگین هاله عدم رشد	ایزوله ها	Mut II	Mut I/III	میانگین هاله عدم رشد
۱	+	+	۲۱	۱۴	+	+	۲۰
۲	+	+	۲۱	۱۵	+	+	۲۲
۳	+	+	۲۳	۱۶	_	+	۱۷
۴	_	+	۱۸	۱۷	_	+	۱۸
۵	_	+	۱۶	۱۸	_	+	۱۷
۶	_	+	۱۸	۱۹	+	_	۱۱
۷	_	+	۱۸	۲۰	+	+	۲۳
۸	+	_	۱۴	۲۱	_	+	۱۶
۹	_	+	۱۹	۲۲	+	_	۱۱
۱۰	+	+	۲۲	۲۳	_	+	۱۹
۱۱	+	_	۱۳	۲۴	_	+	۱۷
۱۲	+	_	۱۴	۲۵	+	_	۱۳
۱۳	_	+	۱۷				

نتایج روش چاهک‌گذاری و دیسک‌گذاری با توجه به پیدایش هاله عدم رشد، نشان داد که از ۳۲ نمونه ایزوله شده، فقط ۲۵ عدد (۷۸/۱۳ درصد) قادر به تولید موتاسین بودند. این نمونه‌ها شامل ۲۰ نمونه از پوسیدگی دندان (۸۰ درصد)، ۴ نمونه از شیار لثه‌ای (۱۶ درصد) و ۱ نمونه (۴ درصد) از نوک زبان بودند (جدول ۵).

بالاترین تیتر موتاسین علیه باکتری اندیکاتور به میزان ۱۲۸ AU در میلی‌لیتر و کمترین آن به میزان ۶۴ AU در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۲ و ۳).



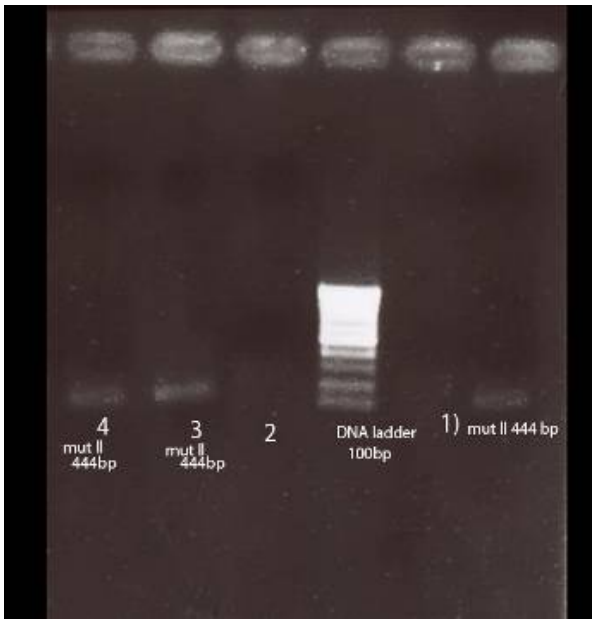
شکل ۲- هاله عدم رشد حاصل از رقت‌های مختلف موتانس.



شکل ۳- قابلیت بازدارندگی موتاسین تولید شده بر باکتری اندیکاتور

نتایج حاصل از بررسی مولکولی نشان داد که از مجموع ۳۲ سویه استرپتوکوکوس موتانس جدا شده از حفره دهانی، ۵۲ درصد آنها برای حضور ژن mut II و ۷۶ درصد آنها برای حضور ژن mut I/III مثبت بودند. به طور کلی، از ۲۵ نمونه تولید کننده موتاسین، ۲۸ درصد آنها برای حضور هر سه ژن mutII و mutI/III در داخل ژنوم خود مثبت بودند.

شکل ۴و ۵ نتایج الکتروفورز سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس از نظر حضورژن mut II(444bp) و I/III mut (۴۵۰/۷۰۰bp) را نشان می‌دهند.



شکل ۴- نتایج الکتروفورز سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس از نظر حضورژن mut II(444bp) بر روی ژل آگارز۱ درصد. چاهک‌های ۱، ۳ و ۴ نمونه‌های بالینی دارای mut II و چاهک ۲ نمونه فاقد این ژن را نمایش می‌دهد.

شکل ۵- نتایج الکتروفورز سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس از نظر حضور ژن I/III mut (۷۰۰/۴۵۰bp) بر روی ژل آگارز۱ درصد. چاهک‌های ۱ و ۴ نمونه‌های بالینی دارای دو ژن و چاهک ۳ نمونه فاقد این دو ژن را نمایش می‌دهند.

بحث

اگرچه تعداد زیادی میکروارگانیسم از حفره دهان عبور می‌کنند، ولی ندرتا به صورت دایمی در دهان جایگزین می‌شوند (۱۲). سطح دندان جایگاه اکولوژیکی بسیار مناسبی برای استقرار استرپتوکوکوس موتانس است (۱۳). از طرفی رقابت جهت اشغال جایگاه‌ها (شیار وسطح دندان) توسط فلور طبیعی باعث ثبات ترکیب مجموعه‌های پلاک دندانی می‌شود (۱۵). به طوری که محققان حضور استرپتوکوکوس موتانس را به ارتباط مستقیم با پوسیدگی دندانی گزارش می‌کنند (۱۲، ۱۴). 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 پلاک های دندانی شده و در نهایت پوسیدگی دندانی حاصل می‌شود (۱۶). بیوفیلم‌های دهانی تحت تاثیر استرس‌های مختلف محیطی مانند نوع مواد غذایی، PH اسیدی (۱۳) و فعالیت موتاسین‌های استرپتوکوکوس موتانس (۱۷) می‌توانند ایجاد شوند.

از لحاظ بالینی، موتاسین‌ها از عوامل مهم و اساسی برای تعادل و استقرار باکتری‌ها در بیوفیلم و پوسیدگی دندانی به شمار می‌آیند. احتمالا سویه‌های تولید کننده موتاسین نسبت به آنهایی که موتاسین تولید نمی‌کنند، توانایی بیشتری را برای کلونیزه شدن در بیوفیلم دندانی و ایجاد پوسیدگی را دارند (۱۸). بنابراین موتاسین‌ها یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ویرولانس در پوسیدگی دندان به شمار می‌آیند (۱۸، ۱۹). به نظر می‌رسد فرآیند بیولوژیکی تولید موتاسین به وسیله برخی از سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس، به آنها امکان رقابت بیشتری را با انواع دیگر استرپتوکوک‌های دهان برای اشغال جایگاه‌های موجود بر روی دندان می‌دهد (۲۰).

در این مطالعه، تاثیر موتاسین تولید شده توسط ایزوله‌های بالینی بر سویه اندیکاتور استرپتوکوکوس موتانس ATCC ۳۵۶۶۸ و ژن‌های مولد موتاسین‌های I/III و II در سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس بررسی شد. این مطالعه نشان داد که سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس جدا شده از پوسیدگی فعال، میزان بالایی از موتاسین را تولید می‌کنند.

با توجه به یافته‌های مراحل مختلف این پژوهش می توان موارد زیر را مورد بررسی قرار داد. نکته اول اینکه استرپتوکوکوس موتانس نسبت به انواع دیگر استرپتوکوک‌های دهانی به راحتی در محیط دندان جایگزین می‌شود. این تفاوت می‌تواند مربوط به توانایی این ارگانیسم در تولید مواد ضدمیکروبی به نام موتاسین باشد. Kamiya و همکارانش در مطالعه خود در سال ۲۰۰۵ تاثیر موتاسین‌های جداشده را بر *S. mutans* 32K, *Streptococcus sobrinus* , *S. mitis* ATCC 903, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *S.*

salivarius 66.4, بررسی کردند. آنها اعلام کردند که استرپتوکوکوس موتانس با توجه به توانایی تولید موتاسین و تاثیر آن بر عدم رشد باکتری‌های دهان می‌تواند در حفره دهانی استقرار یافته و عامل اصلی پوسیدگی دندان باشد (۶). نتایج این تحقیق با توجه به اثر باکتریوسیدی موتاسین‌های جدا شده از ایزوله‌ها بر روی باکتری اندیکاتور، این موضوع را تصدیق می‌کند و با نتایج Kamiya و همکاران همسویی دارد. بنابراین اگر رژیم غذایی دارای ساکارز فراوان باشد، شرایط رشد برای استرپتوکوکوس موتانس فراهم شده و احتمال افزایش موتاسین و در نهایت پوسیدگی بیشتر خواهد شد.

نکته دوم این تحقیق نتایج حاصل از بررسی مولکولی برخی از عناصر ژنتیکی می‌باشد. اگرچه توانایی استرپتوکوکوس موتانس در ایجاد پوسیدگی‌ها شناخته شده، ولی هنوز مطالعات متعددی در خصوص فاکتورهای ویرولانس از جمله موتاسینی که درایجاد پوسیدگی آن شرکت می‌کنند، در دست بررسی می‌باشد. داده‌های این تحقیق نشان داد که ژن‌های mut I/III و mut II در اغلب ایزوله‌های استرپتوکوکوس موتانس برگرفته شده از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، یافت می‌شوند. میزان فراوانی سویه‌های استرپتوکوکوس موتانس حاوی ژن mut II در پوسیدگی دندان و شیار لثه‌ای ۵۲ درصد و حضور ژن mut I/III نیز۷۶ درصد مشاهده شد.

در سال ۲۰۰۵، Kamiya در پژوهش خود گزارش می‌کند که به علت حضور سویه‌های حامل ژن‌های فوق، میزان تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس و پوسیدگی افزایش می‌یابد (۶). از طرفی، Qi در گزارش خود بیان می‌کند که موتاسین I محصول سلول‌های شرکت کننده در بیوفیلم است (۱۷). هم چنین مطالعات Napimoga و Kamiya بیانگر این مطلب است که سویه‌های استرپتوکوک موتانس در حفره دهانی افراد مستعد دارای طیف پهناور تولید موتاسین I/II/III می‌باشند (۲۱).

در مطالعه حاضر، سویه‌های دارای ژن‌های mut I/III با قدرت آنتاگونیستی بالا، اغلب از افراد دارای پوسیدگی فعال جدا شده بود و هم چنین فراوانی هم زمان ژن‌های mutII و mut I/III فقط در بیماران مشاهده شده بود. این می‌تواند حاکی از ارتباط نقش موتاسین در شکل گیری بیوفیلم و ایجاد پوسیدگی دندانی بیماران در شرایط محیطی مناسب از لحاظ دما و حضور مواد غذایی باشد.

نظر به اینکه معیارهای مورد بررسی این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بوده، عملکرد سویه‌ها در شرایط invivo می‌تواند متغیر باشد.

بر اساس تحقیقات Mota – meira و همکارانش در سال ۲۰۰۵، نوعی موتاسین (B_Ny266) تولید شده توسط استرپتوکوکوس موتانس قادر به مهار رشد برخی از باکتری‌های گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط in vitro است. این محققان با تزریق موتاسین مورد نظر به موش‌های آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس، مشاهده کردند که این موتاسین در شرایط invivo نیز از رشد باکتری جلوگیری و باعث بهبود حیوان می‌شود (۲۲).

گزارش Petersen و همکارانش در سال ۲۰۰۶ حاکی از عدم تولید موتاسین توسط برخی از سویه‌ها در شرایط ازمایشگاهی می‌باشد (۲۳). از طرفی در همان سال Nicolas و همکارانش در مطالعات خود بیان می‌کنند که در شرایط invivo میزان pH (۲ تا ۱۱) متغیر است و محیط‌های اسیدی و قلیایی می‌توانند در تکثیر سویه‌ها و تولید موتاسین بسیار موثر باشند و این امر در ایجاد پلاک و پوسیدگی دندان توسط این باکتری‌ها در شرایط invivo بسیار تاثیرگذار است (۲۴).

در ضمن، مطالعه Kamiya و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان داد که در شرایط invitro میزان ساکارز در افزایش تولید موتاسین توسط استرپتوکوکوس موتانس نقش دارد و پوسیدگی دندان را سبب می‌شود (۶) . اما تجربیات اولیه در شرایط invivo در مورد هامسترهای غیرفعال از نظر پوسیدگی نشان داد که حتی هنگامی که رژیم غذایی غنی از ساکارز باشد، منجر به پوسیدگی دندان نمی‌شود، مگر آنکه از ضایعات پوسیدگی جوندگان دیگر به حفره دهانی هامسترهای فاقد پوسیدگی تلقیح شود (۲۵). تولید موتاسین تحت تاثیر عوامل محیطی وژنتیکی متغیر است، به طوری که برخی از سویه‌ها قابلیت تولید بالایی دارند و در برخی دیگر از میزان بیان آنها کاسته می‌شود. اما قدر مسلم طبق گزارشات منتشر شده، ارتباطی بین میزان تولید موتاسین و وضعیت پوسیدگی دندان وجود دارد (۲۶، ۲۷).

با توجه به نتایج به دست آمده از افراد دارای پوسیدگی فعال دندان، چنین به نظر می‌رسد که شرایط حفره دهانی آنها در میزان pH تاثیر داشته و بستر مناسبی را برای استقرار استرپتوکوکوس موتانس، تولید موتاسین و در نهایت پوسیدگی دندان مهیا می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، از کارکنان محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. McKay LL, Baldwin KA. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbial Revs1990; 87: 3-14.
2. Kleerebezem M, Quadri LE. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. Peptides. 2001; 22: 1579-96.
3. De Vuyst L, Vandamme EJ, eds. Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic and Professional; 1994. p.91-142.
4. Facklam R. What happened to the streptococci. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 613-30.
5. Balakrishnan M, Simmonds RS, Killian M, Tagg JR. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. J Med Microbiol 2002; 51: 941-48.
6. kamiya RU, Napimoga MH, Hofling JF, Gongalves RB. Frequency of four different mutacin genes in *streptococcus mutans* genotypes isolated from caries- free and caries- active individuals. J Med Microbiol 2005; 54: 599-604.
7. Cvitkovitch DG, Li YH Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. J Clin Invest 2003; 112: 1626-32.
8. Boone DR, Castenholz RW, eds. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. New York: Springer; 1989.
9. Schoolins SR, Charaf UK, Allison DG, Gilbert P. A role for rhamnolipial in biofilm dispertion. Biofilms 2004; 1: 91-99.
10. Herisstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J Microbiol Methods 2001; 44: 172-89.
11. Mayr- Hartings A, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. Methods Microbiol 1972; 7: 315-422.
12. Sturdevant FM, ed. The art and Science of operative dentistry. 2nd ed. New York: Mosby Co.; 1985.
13. Carlsson J. Microbial aspects of frequent intake of products with high sugar concentrations. Scand J Dent Res 1989; 97: 110–14.
14. Hemati Y, ed. Pathogenic bacteria in humans. Tehran: Jihad martyr of Beheshti University of Medical Committee; 1987. p.81-132. [In Persian]
15. Yaghmaii M, ed. Oral and maxillofacial surgery. Tehran: Bavardaran Publisher; 1987. p.245-76. [In Persian]
16. Jawets A, Melnick J, Adelberg EA. Review of medical microbiology. A Lange Medical Book.17th ed. NewYork: Appleton and Lange; 1998. p.212-14.
17. Qi F, Chen P, Caufield PW. The group I strain of Streptococcus mutans, UA140, produces both the llantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 15–21.
18. 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: 1092–94.
19. Novak J, Caufield PW, Miller EJ. Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from *S. mutans*. J Bacteriol 1994; 176: 4316–20.
20. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EAM, Gilbert SC, Clark DT, Alam S, et al. Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. Appl Environ Microbiol 2003; 69; 6475-80.
21. Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EAR, Höfling JF, Mattos-Graner RO, et al. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 2005; 53: 697–703.
22. Mota-Meira M, Morency H, Lavoi MC. *In vivo* activity of mutacin B-Ny266. J Antimicr Chemother 2005; 56: 869-71.
23. Peterson FC, Fimland G, Scheie AA. Purification and functional studies of a potent modified quorum-sensing peptide and a two-peptide bacteriocin in *Streptococcus mutans*. Mol Microbiol 2006; 61: 1322-34.
24. Nicolas G, Morency H, LaPointe G, Lavoie MC. Mutacin H-29B is identical to mutacin II (J-T8). BMC Microbiol 2006; 6: 36.
25. Azizi K. The role of nutrition in children to prevent.2000; 1: 744. [In Persian]

26. Yoshida A, Kuramitsu HK. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 6283-91.

27. Grnroos L, Saarela M, Matto J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteriocin from mother to child. Infect Immun 1998; 66: 2595-600.