

شناسایی سویه‌های دهانی گونه‌های لاکتوباسیلوس در افراد مبتلا به پریودنتیت مزمن و افراد سالم

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۶/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۲

چکیده

مقدمه و هدف: پریودنتیت مزمن یکی از بیماری‌های عفونی دهانی متداول بزرگسالان است که باعث التهاب و تخریب بافت پریودنتال و از دست رفتن استخوان و اتصالات آن می‌شود. امروزه با افزایش مقاومت‌های میکروبی، باکتری درمانی روشی جایگزین جهت پیش‌گیری از بیماری‌های التهابی دهان است که با تنظیم میکروبیوتای دهان و حذف باکتری پاتوژن به حفظ سلامت دهان و دندان کمک می‌کند. هدف از این مطالعه شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس دهانی در افراد مبتلا به پریودنتیت و سالم، معرفی سویه‌های غالب در دو گروه است.

مواد و روش‌ها: کاربرد محیط کشت اختصاصی و روش مولکولی *RFLP-PCR 16srDNA* با استفاده از پرایمرهای یونیورسال برای شناسایی سویه‌های دهانی لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه‌های حفره دهان (بزاق، پلاک زبان و لثه) از ۵۹ بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن و ۵۹ فرد سالم. انجام توالی‌یابی دوطرفه از الگوهای برش منتخب.

یافته‌ها: از ۳۵۴ ایزوله مورد بررسی بر اساس نتایج کشت و *PCR 254* ایزوله لاکتوباسیلوس مثبت بودند. بر اساس نتایج توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از الگوهای برش آنزیمی جامعه لاکتوباسیلوس‌های جدا شده دهانی به ۱۰ گونه مختلف گروه‌بندی شد. لاکتوباسیلوس پاراکازئی، فرمتوم گونه غالب در افراد پریودنتیت و لاکتوباسیلوس کازئی، پلانتروم گونه غالب در افراد کنترل بودند.

نتیجه‌گیری: فراوانی نسبی لاکتوباسیلوس‌ها در افراد پریودنتیت مزمن با مقایسه گروه کنترل به‌ویژه در نمونه‌های پلاک زیر لثه کاهش معنی‌داری داشت. فراوانی نسبی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده در نمونه‌های بیماران، ۸٪ کمتر از افراد کنترل است. امروزه شواهد زیادی مبنی بر استفاده از سویه‌های لاکتوباسیلوس‌ها در پیش‌گیری از پریودنتیت مزمن و ایجاد تعادل فلور نرمال حفره دهان وجود دارد. پیش‌بینی می‌شود که سویه‌های برتر برای اهداف باکتری درمانی و استفاده در صنعت دارویی به کار روند.

کلمات کلیدی: بیماری پریودنتیت مزمن، *16srDNA RFLP-PCR*، سویه‌های دهانی لاکتوباسیلوس

عنایت کلانتر^۱، ارغوان اعتباریان^{۲،۳}، سید محمود امین مرعشی^۴، کوروش کبیر^۵، ابودر مرادی^۶، عاطفه شموسی^۷، طاهره ششپری^۸

^۱ بخش میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۲ بخش آسیب شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۳ مرکز تحقیقات پروبیوتیک و مکمل‌های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۴ بخش میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
^۵ گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۶ بخش پروبیوتیک‌سوزی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۷ گروه آناتومی و تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۸ کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

^۹ نویسنده مسئول:

کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۰۹۱۹-۲۶۰۲۰۸۹

E-mail: tata.sh800@gmail.com

مقدمه

تعداد بسیار زیاد و متنوعی از باکتری‌های فلور در نقاط مختلف بدن از جمله در حفره دهان، مجرای روده‌ای، پوست و واژن وجود دارند. باکتری‌های اسیدلاکتیکی بخش عمده فلور میکروبی در دهان و روده انسان و حیوانات محسوب می‌شوند که با کلونیزه شدن در بخش‌های مختلف سیستم گوارشی موجب تحریک سیستم ایمنی در بدن میزبان می‌شوند و فعلا نه در حفظ سلامتی بدن همکاری می‌کنند.^۱ از طرف دیگر باکتری‌های اسیدلاکتیکی از جمله لاکتوباسیلوس ها با تولید مواد ضد میکروبی از جمله اسیدلاکتیک و استیک اسید و اسیدهای ارگانیک و... مانع از رشد پاتوژن ها در سیستم های اکولوژیک بدن مانند حفره دهان و لوله گوارشی می‌گردند.^۲ این جمعیت میکروبی ساکن و سودمند با توسعه سیستم ایمنی میزبان به وسیله بیان واسطه‌هایی پاسخ‌های ایمنی را تنظیم و مکانیسم‌های تعادل سلولی را افزایش می‌دهند.^۳ باکتری‌های اسیدلاکتیک گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که بر اساس مجموعه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیک، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه بسیار بزرگ قرار گرفته‌اند. اسیدلاکتیک مهم‌ترین محصول آن‌ها از تخمیر کربوهیدرات‌ها است. این باکتری‌ها دارای دیواره پپتیدوگلیکان ضخیم چندلایه است که همراه با پروتئین‌ها، تایکوئیک اسید و پلی ساکاریدهای مختلف آرایش پیدا کرده است.^۴ تولید فراورده‌های پروبیوتیک بدون شک یکی از مهم‌ترین کاربردهای باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) است که بزرگ‌ترین گروه باکتری موجود در این نوع محصولات را تشکیل می‌دهند. حضور مواد غذایی فراوان، سلول‌های اپیتلیال مرده و ترشح بزاق، حفره دهانی را به محیطی مساعد برای رشد باکتری‌ها تبدیل می‌کند.^۵ حفره دهان افراد سالم دارای فلور میکروبی متعادل است، بیش از ۷۰۰ گونه میکروبی در حفره دهان ساکن است. مطالعات نشان داده است هر نوع اختلال در تعادل میکروبی سبب افزایش باکتری‌های پاتوژن و کاهش باکتری‌های مفید شده که منجر به اختلالات دهانی مانند پرودنتیت یا پوسیدگی دندان می‌شود.^۶ بیماری پرودنتیت مزمن، بیماری التهابی شایع در افراد بزرگسال است که منجر به تخریب بافت‌های نگهدارنده دندان (لثه و استخوان زیرین) می‌شود. بیوفیلم باکتریایی که در سطوح دندان و

در نزدیکی محل اتصال بافت‌های پرودنتال به دندان تشکیل می‌شود، مهم‌ترین عامل ایجاد پرودنتیت مزمن است.^۷ اختلال در این تعادل میکروبی سبب افزایش میکروب‌های پاتوژن و کاهش میکروبیوتا یا مجموعه باکتری‌های مفیدی می‌شود که در بعضی از قسمت‌های بدن ساکن هستند و گاهی اوقات تا پایان عمر باقی می‌مانند. این جمعیت میکروبی نقش مهمی در ایجاد سلامت بدن دارند و متنوع‌ترین جمعیت فلور انسان در روده و حفره دهان قرار دارد. وجود طیف وسیعی از این میکروب‌های مضر در بیوفیلم‌های دندان باعث ایجاد تحریک سیستم ایمنی و در نتیجه ایجاد شرایط التهابی مزمن می‌شود. پرودنتیت مزمن مهم‌ترین عامل از دست دادن دندان در میان افراد بزرگسال و افراد با نقص ایمنی و دیابت نوع II است.^۸ بیماری پرودنتیت می‌تواند به‌عنوان ریسک فاکتورهای دخیل در بیماری‌های سیستمیک بالینی مهم باشد. پروبیوتیک‌های دهانی که تاکنون شناسایی شده‌اند از لحاظ اثر و ویژگی‌ها در شرایط آزمایشگاه بررسی شده‌اند از جمله کاهش تولید اسید و بوی دهان، نداشتن خطر پوسیدگی دندان، نداشتن پتانسیل انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی و پارامترهای سمی عمومی و بیماری‌های سیستمیک.^۹

از مواردی که می‌توان برای تعادل میکروبیوتا استفاده کرد، باکتری‌های پروبیوتیکی هستند که در واقع میکروارگانیزم‌های زنده‌ای می‌باشند که با مصرف به مقدار کافی برای سلامتی میزبان مفید می‌باشند. از جمله پروبیوتیک‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها هستند که با تولید کوفاکتورها، مواد آنتی‌باکتریال (باکتریوسین) و واکنش متقابل با فاکتورهای بیماری‌زای باکتری‌های پاتوژن از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کنند و همچنین باعث افزایش پاسخ ایمنی میزبان (با تولید ایمنوگلوبولین و پروتئین‌های ترشحی دفاعی) شده و با کاهش واکنش‌های پیش‌التهابی و اختلال بافتی از حضور باکتری‌های پاتوژن دهانی ممانعت می‌کند.^{۱۰}

در حال حاضر از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دهان و دندان استفاده می‌شود. با این حال به علت مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید مصرف آن‌ها محدود شود. با شناخت جامعه از تأثیرات جانبی و نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها، بکارگیری پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عوامل درمانی رو به گسترش است.^{۱۱} طی دهه‌های اخیر به دلیل افزایش

مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف، استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک ها به عنوان عوامل آنتی باکتریال در بسیاری از کشورهای پیشرفته ممنوع شده است، بنابراین امروزه تقاضای روزافزونی برای یافتن جایگزین مؤثری به جای ترکیبات آنتی بیوتیکی وجود دارد که در این راستا روش باکتری درمانی با باکتری های پروبیوتیکی می تواند این خلأ را پر کند.^{۱۲} بر اساس مطالعه انجام شده شیوع بیماری پریدونتیت در کشورهای امریکا، ژاپن به ترتیب تقریباً ۷۵٪، ۷۴٪ تخمین زده شده است.^{۱۳} این مطالعه نشان داده که بیماری پریدونتیت بر کیفیت زندگی مؤثر بوده و باعث افزایش خطر اختلالات سیستمیک مانند بیماری های قلبی - عروقی، مغزی - عروقی، دیابت، زایمان زودرس، عفونت های تنفسی و... می شود.^{۱۴}

هدف از این مطالعه، عملی کردن روشی برای ایزوله لاکتوباسیلوس ها از نمونه های جمع آوری شده حفره دهان، ارزیابی کاربرد روش کشت اختصاصی برای غربالگری لاکتوباسیلوس ها، مقایسه فراوانی نسبی لاکتوباسیلوس ها در بزاق دهان و پلاک زبانی و دندان (زیر لثه) با روش وابسته به کشت و توصیف تنوع فراوانی گونه ها با روش مولکولی *16srDNA RFLP-PCR* و *Two-way Sequencing* می باشد.

مواد و روش ها

این پژوهش از نوع مطالعه مقطعی توصیفی تحلیلی بوده و به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز رسیده است. نمونه پژوهش شامل ۵۹ بیمار مبتلا به پریدونتیت مزمن متوسط و شدید که به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز مراجعه کرده اند و ۵۹ فرد سالم (بدون سابقه پریدونتیت) و همسان از نظر سنی و جنسی در گروه کنترل که از بین مراجعه کنندگان همان مرکز وارد مطالعه شدند می باشند. معیارهای ورود به مطالعه محدوده سنی ۷۰-۲۵ سال، ابتلا به پریدونتیت مزمن متوسط و شدید با عمق پاکت بیش از 3mm در بیشتر از ۴ ناحیه دندان، از بین رفتن اتصالات کلینیکی و تشکیل پاکت های پریدونتال به همراه التهاب لثه، خونریزی هنگام پروب کردن، تحلیل استخوان بوده است. معیارهای خروج شامل زنان باردار، افراد دیابتیک، افراد نیازمند به درمان پروفیلاکسی با آنتی بیوتیک در درمان های مرتبط با دندان پزشکی،

افراد مبتلا به بیماری های اتوایمیون، افراد مبتلا به بیماری های پریدونتال نکرورزشونده، سابقه انجام درمان های پریدونتال طی ۶ ماه اخیر، استفاده از آنتی بیوتیک یا سایر داروهای ضدالتهابی در طی ۳-۴ ماه اخیر و افراد سیگاری بودند. بعد از پذیرش بیماران در بخش پریدونتولوژی و اطمینان از نوع پریدونتیت نمونه گیری انجام شد. از همه بیماران و افراد گروه کنترل ۳ نمونه شامل پلاک دندانی، پلاک زبانی و بزاق دهان گرفته شد. پلاک دندانی این افراد در فک بالا یا پایین از دندان ۶ یا در صورت عدم وجود جرم در دندان ۶، از دندان دیگر با بیشترین جرم و عمق پاکت پریدونتال توسط کورت گریسی (*Gracy curette*) نمونه گرفته شد به این صورت که هنگام برداشت پلاک دندانی بالا و پایین لثه با گذاشتن رول کتان از آغشته شدن پلاک با بزاق دندان جلوگیری شد. سپس نمونه برداشته شده مستقیماً به محیط کشت اختصاصی (*LBS broth*) منتقل شد. نمونه های پلاک زبانی توسط سوآپ پنبه ای استریل از سطح دورسال (پشتی) زبان در منطقه به وسعت $2/16 \text{ cm}^2$ با کمی فشار و چرخاندن (حدود ۵ بار) برداشته و سپس نمونه مستقیماً به محیط کشت اختصاصی (*LBS broth*) منتقل شد.^{۱۵} نمونه بزاق غیر تحریکی (نگهداشتن بزاق در دهان به مدت ۱-۲ دقیقه) به مقدار 1-3cc توسط داوطلب در داخل لیوان استریل حاوی ۳-۱cc محیط ترانسپورت *LBS* مایع گرفته شد (رقت 1/2). نمونه ها در ظرف یا فلاسک یخ قرار داده شد و تا ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل می گردید. نمونه ها روی محیط کشت اختصاصی اصلاح شده *agar mMRS* حاوی مقدار مناسبی از مکمل ها (ونکومایسین هیدروکلراید، سیستین هیدروکلراید، بروموکرزول گرین) و *LBS broth* کشت داده شد و ۷۲ ساعت انکوباسیون در جار بیهوازی حاوی گاز بیک انجام گرفت.^{۱۶} از کلنی های اختصاصی رشد یافته برای استخراج ژنوم استفاده شد. لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعته در $(2000 \times \text{g} / 5 \text{ min} / 4^\circ\text{C})$ سانتریفوژ و جهت استخراج DNA باکتری استفاده گردید. از روش اصلاح شده *salting out* برای استخراج ژنوم باکتریایی استفاده گردید.^{۱۷} ۵۰۰ میکرولیتر رسوب حاصل در ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز متشکل از: *Tris-Hcl* نیم مولار ۱۰ میکرولیتر، EDTA نیم مولار ۲۵ میکرولیتر، *NACL* ۵ مولار ۱۰ میکرولیتر، SDS ۱۰٪ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر، *proteinase K* ۳ میکرولیتر حل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد

روی ژل آگارز ۱/۵٪، واکنش های آنزیمی محصولات بدست آمده را روی ژل بارگذاری می‌کنیم. براساس وزن و تعداد باندهای بدست آمده نمونه ها را گروه بندی کرده واز هر گروه ۲-۳ نمونه سکانسینگ دو طرفه انجام شد.

نتایج

در تحقیق حاضر ۵۹ نفر داوطلب بعنوان گروه بیمار در محدوده سنی ۲۵-۷۰ سال شرکت نمودند. از این تعداد افراد ۲۹ نفر مرد و ۳۰ نفر زن با میانگین سنی $48 \pm 10/06$ سال. همچنین تعداد ۵۹ داوطلب بعنوان گروه شاهد در محدوده سنی ۲۵-۷۰ سال شرکت نمودند. از این تعداد افراد ۲۹ نفر مرد و ۳۰ نفر زن با میانگین سنی $36/7 \pm 10/80$ سال بودند. از هر آزمودنی ۳ نمونه (بزاق، پلاک زبان، پلاک لثه) و مجموعاً ۱۷۷ نمونه در هریک از گروههای مورد و شاهد به دست آمد. از مجموع ۱۷۷ نمونه های ایزوله دهانی به دست آمده از ۵۹ داوطلب بیمار، در ۱۲ ایزوله عدم رشد وجود داشت. ۱۲۰ نمونه (۶۷/۸٪) باکتری لاکتوباسیل ایزوله گردید. از این تعداد ۵۳ ایزوله (۸۹/۸٪) از بزاق دهان و ۴۷ ایزوله (۷۹/۶٪) از پلاک زبان و ۲۰ ایزوله (۳۳/۹٪) از پلاک دندان (زیر لثه) شناسایی شد. از مجموع ۱۷۷ نمونه های ایزوله دهانی به دست آمده از ۵۹ داوطلب سالم، در ۲۱ ایزوله عدم رشد وجود داشت. ۱۳۴ نمونه (۷۵/۷٪) باکتری لاکتوباسیل ایزوله شد. از این تعداد ۴۷ ایزوله (۷۹/۶٪) از بزاق دهان و ۴۹ ایزوله (۸۳/۱٪) از پلاک زبان و ۳۸ ایزوله (۶۴/۴٪) از پلاک لثه شناسایی شد (جدول ۱).

نتایج تکثیر محصول واکنش آنزیم تگ پلیمرز با مقایسه شاخص استاندارد ۳۰۰۰ bp در الکتروفورز، ظهور باندهایی بطول ۱۵۴۵ bp روی ژل آگارز ۱٪ را تایید کرد (شکل ۱).

طبق نتایج به دست آمده بیشترین درصد فراوانی در افراد سالم گونه کازئی (۱۹/۴٪) و در افراد پریدنتیت متعلق به گونه پاراکازئی (۲۱/۷٪) و کمترین فراوانی متعلق به گونه واژینالیس (۰/۸٪) در گروه پریدنتیت می باشد. (نمودار ۱) همچنین دو نمونه از مقایسه شکل ماکروسکپی و میکروسکپی از گونه ها در شکل نشان داده شده است (شکل ۲).

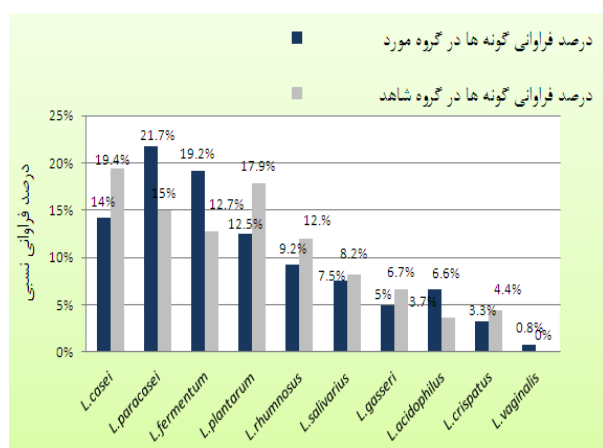
سپس به اندازه ۱/۳ حجم آن NaCl شش مولار اضافه کرده، ۳۰ دقیقه در دور 3400rpm و دمای ۱۰° سانتیفریژ شد. فاز بالایی را به لوله دیگر منتقل کرده و سپس معادل ۰/۷ حجم آن ایزوپروپانل یا اتانل مطلق سرد به آن اضافه گردید. سپس لوله ها ۱۷ دقیقه در دور 4000rpm و دمای ۱۰° سانتیفریژ شد. فاز رویی را دور ریخته و به رسوب سفید ته لوله ۱۰۰۰-۵۰۰ میکرو لیتر اتانل ۷۰٪ اضافه گردید. سپس لوله ها ۵ دقیقه با دور 12000rpm و دمای ۱۰° سانتیفریژ شد. (۲ بار تکرار).

لوله را در معرض هوای اتاق خشکانده و ۵۰-۱۰۰ میکرو لیتر به آن بافر Elution اضافه شد. لوله ها را به مدت ۲-۳ روز در یخچال گذاشته تا کلاف ژنومی کاملاً حل شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و جذب نوری مورد تایید قرار گرفت.

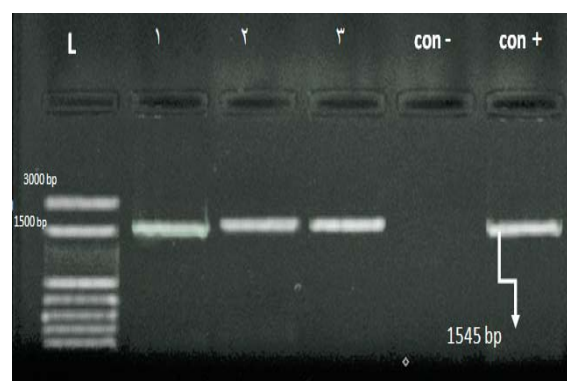
با استفاده از پرایمرهای 16s یونیورسال 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3 27f و 5' AAGGAGGTGATCCARCCGCA3' (سیناکلون) واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد و به محصول بدست آمده آنزیم های محدود *Taq I, Hae III* (ترموساینس) طبق پروتکل اضافه گردید و هضم آنزیمی انجام گرفت.^{۱۸،۱۹} پروتکل تکثیر ژنوم باکیت سیناکلون به صورت ذیل است: $16 \mu l D.D.W$ ، $10 \times PCR \text{ buffer } 2 \mu l$ ، $5' \text{ Primer-f, R } 0.3 \mu l$ ، $dNTPs (25 Mm) 0.5 \mu l$ ، $MgCl_2 (50 Mm) 0.5 \mu l$ ، $DNA \text{ template } (50 ng) 5 \mu l$ ، $Taq \text{ polymerase } 25 \mu l$ ، $Total \text{ volume } 100 \mu l$ تکثیر توسط دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد تعداد سیکل تکثیر ۳۰-۳۲ بود. برنامه دمایی به صورت زیر بود: دناتور شدن در ۹۵° ۵ دقیقه و ۹۵° ۴۵ ثانیه و اتصال پرایمر در ۵۷° ۱ دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲° ۱/۵ دقیقه و واکنش تکثیر دوم در ۷۲° ۱۰ دقیقه و انکوباسیون. بعد از تکمیل و گسترش پرایمرها جهت آشکارسازی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از بافر $TBE 1 \times$ استفاده گردید. از Ladder ۳۰۰۰ bp (سیناکلون) به عنوان مارکر مولکولی مورد استفاده قرار گرفت که باند حدود ۱۵۴۵ bp مورد نظر است. بعد از بدست آمدن محصول ۱۰ میکرو لیتر از آن را برای RFLP یا هضم آنزیمی با ۷ میکرو لیتر آب مقطر و ۲ میکرو لیتر بافر و ۱ میکرو لیتر Taq I or Hae III استفاده گردید. به منظور مشاهده نتایج باندهای حاصل از برش آنزیمی

جدول ۱: فراوانی نتایج مثبت کشت ایزوله ها در دو گروه را نشان میدهد، نتایج کشت در نمونه پلاک دندانی (زیر لثه) در گروه بیمار کاهش معنی داری دارد.

P value	مقایسه فراوانی نسبی نتایج کشت مثبت ایزوله های دهانی			متغیر
	گروه شاهد	گروه مورد	کل	
	تعداد (درصد فراوانی)	تعداد (درصد فراوانی)	تعداد (درصد فراوانی)	
۰/۱۲۴	۴۷ (۰/۷۹/۶)	۵۳ (۰/۸۹/۸)	۱۰۰ (۰/۸۴/۷)	بزاق
۰/۸۱۰	۴۹ (۰/۸۳/۱)	۴۷ (۰/۷۹/۶)	۹۷ (۰/۸۲/۲)	پلاک زبان
۰/۰۰۱	۳۸ (۰/۶۴/۴)	۲۰ (۰/۳۳/۹)	۵۸ (۰/۴۹/۱)	پلاک دندان
۰/۳۴۲	۵۲ (۰/۸۸/۱)	۵۵ (۰/۹۳/۲)	۱۰۷ (۰/۹۰/۷)	کل (حداقل یکی از سه نمونه دهانی)

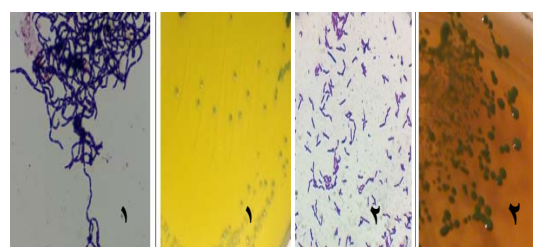


نمودار ۱: فراوانی نسبی کل گونه ها در گروه مورد و شاهد



شکل ۱: مشاهده باندهای بطول ۱۵۴۵ bp تایید ایزوله های لاکتوباسیلوس است. برای کنترل مثبت از نمونه PTCC لاکتوباسیلوس پلانتروم استفاده شد

همچنین گونه های ۱- پاراکاژی ۲- فرمنتوم ۳- سالیواریوس به ترتیب بیشترین فراوانی را در نمونه پلاک دندان (زیر لثه) دارا بود و شدت پریودنتیت تأثیری برگونه خاص نداشت. از بین ۲۵۴ نمونه ایزوله های دهانی کشت مثبت براساس *16srDNA partial sequencing*، ۱۰ الگوی برش آنزیمی و ۱۰ گونه لاکتوباسیلوس در افراد پریودنتیت و ۹ گونه در افراد سالم غیرپریودنتیت شناسایی شد (شکل ۳).



شکل ۲: نمونه تصاویر ماکرو، میکروسکوپی

۱: *L. rhamnosus*، ۲: *L. plantarum*

بیماری دهانی مزمن، پریدونتیت است که در نتیجه تغییر تعادل میکروبیوتای ساکن در دهان افراد بزرگسال ایجاد می‌گردد. علت این بیماری التهابی، استقرار تعداد باکتری‌های پاتوژن دهانی مانند پورفیروموناس جینجیوالیس و... در حفره دهان است.^۷ با توجه به شرایط دهانی خاص افراد پریدونتیت، نتایج فراوانی لاکتوباسیلوس‌های ایزوله شده در این گروه به‌ویژه در نمونه پلاک دندان کاهش چشمگیری نشان داد. در این افراد کنترل و حفظ تعادل باکتری‌های مفید دهانی با منشأ داخلی در نگهداری سلامت دهان دارای اهمیت است. در این مطالعه شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس توسط محیط کشت اختصاصی *mMRS agar* که به دلیل افزودن مکمل‌های ذکر شده تسهیل شد. محیط کشت mMRS در ایزوله خالص لاکتوباسیلوس‌ها کمک فراوانی کرد و از تداخل رشد باکتری‌های اسید لاکتیک دیگر ممانعت کرد. در این تحقیق جهت شناسایی دقیق‌تر گونه‌های لاکتوباسیلوس ضمن استفاده از روش کشت اختصاصی از روش مولکولی، با استفاده از روش آنالیز پلی مرفیسم قطعات محدود در *16srDNA genes* (*16srDNAPCR* و *RFLP - PCR*) و پرایمرهای یونیورسال شناسایی گونه‌ها انجام شد. نتایج حاصل و تعیین توالی دوطرفه بر اساس ژن *16srDNA* گونه‌های منتخب به مقدار زیادی شناسایی سویه‌های باکتریایی را تسهیل می‌کند. مطالعات نشان داده است که تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای خواص مفیدی است زیرا سبب تقویت کولونیزاسیون و پایداری استقرار باکتری‌های اسیدلاکتیک در موکوس میزبان گشته و مانع از کولونیزاسیون باکتری‌های پاتوژن و تنظیم ایمنی میزبان می‌شود.^۴ این باکتری‌ها با تولید مواد آنتی باکتریال و اسیدهای ارگانیک و همچنین واکنش متقابل با فاکتورهای بیماری‌زای باکتری‌های پاتوژن از استقرار و عملکرد تخریبی آن‌ها ممانعت به عمل آورده و سبب کاهش واکنش‌های التهابی و اختلال بافتی پریدونتال در افراد مبتلا به پریدونتیت می‌شوند.^۷ امروزه پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک موضوع مهم در علم پزشکی پدیدار شده‌اند که قادرند ارتباط بین رژیم غذایی و سلامت دهانی را تسریع بخشند. بنابراین کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها در مراقبت‌های دهانی و پیشگیری از پریدونتیت می‌تواند فواید سلامتی فراوانی داشته باشد.^{۱۱}



شکل ۳: تصاویر الگوهای برش بر روی ژل از چپ به راست

1. *L. casei*, 2. *L. crispatus*, 3. *L. gasseri*, 4. *L. vaginalis*, L-Ladder, 5. *L. rhamnosus*, 6. *L. paracasei*, 7. *L. casei*, 8,9. *L. acidophilus*

بحث

باکتری‌های اسیدلاکتیکی بخش بزرگی از باکتری‌های فلور نرمال انسان را تشکیل می‌دهند و لاکتوباسیلوسها یکی از اعضای این گروه می‌باشد. این باکتری‌ها در نقاط مختلف حفره دهانی از جمله: موکوس دهان، لثه، سطح سخت، بزاق، زبان، بیوفیلم‌های بالا و زیر لثه می‌توانند ساکن باشند. تعدادی از گونه‌های لاکتوباسیلوس تحت عنوان پروبیوتیک عمدتاً در صنعت داروسازی و مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. لاکتوباسیلوس پلانتراروم، اسیدوفیلوس، رامنوسوس، کازئی، فرمنتوم، بولگاریکوس در میان فراوان‌ترین لاکتوباسیلوسهای مورد استفاده در محصولات پروبیوتیکی می‌باشند.^۲ در مطالعه انجام شده حاضر ۱۰ گونه مختلف جنس لاکتوباسیلوس از ایزوله‌های دهانی افراد سالم و پریدونتیت شناسایی شد که از میان آنها فراوان‌ترین لاکتوباسیلوسهای دهانی، گونه‌های لاکتوباسیلوس کازئی، پلانتراروم، پاراکازئی، فرمنتوم به ترتیب در دو گروه شناسایی شدند که با نتایج حاصل از شناسایی گونه بزاق دهانی افراد سالم توسط محققین تایلندی و برزیلی و ژاپنی (در سال ۲۰۰۱، ۲۰۱۲، ۲۰۱۵) مشابهت داشت. براساس گزارشات محققین در مقالات، نتایج شناسایی سویه‌های دهانی ممکن است به دلیل محصولات و عادات غذایی متنوع در کشورهای مختلف متفاوت باشد. تشابه گونه‌های دهانی شناسایی شده در مطالعه حاضر با گونه‌های مدفوع شناسایی شده توسط ماهیچی در سال ۲۰۱۱ نشان دهنده پایداری و بقای گونه‌های پروبیوتیکی در دستگاه گوارش است.^۶ متداول‌ترین

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می دهد فراوانی کل لاکتوباسیلوس های شناسایی شده در افراد مبتلا به پریودنتیت مزمن و افراد سالم به ترتیب ۶۷/۷٪ و ۷۵/۷٪ می باشد. نتایج فراوانی لاکتوباسیلوس های بدست آمده در نمونه های بزاق و پلاک زبان در دو گروه تغییر چشمگیری نداشت که به دلیل استفاده عموم مردم از محصولات حاوی باکتریهای پروبیوتیکی می باشد ولی نتایج فراوانی باکتری ها در نمونه پلاک زیر لثه در دو گروه اختلاف معنی داری را

نشان داد. کاهش در فراوانی باکتری های رشد یافته در جدایه های پلاک دندانی (زیر لثه) افراد مبتلا به پریودنتیت نشان دهنده عدم توازن و جایگزینی باکتری های مفید دهانی در بافت پریودنتال می باشد. امروزه شواهد زیادی مبنی بر استفاده از سویه های لاکتوباسیلوس هادر پیش گیری از بیماری پریودنتیت مزمن وجود دارد. پیش بینی می شود که سویه های برتر برای اهداف باکتری درمانی و استفاده در صنعت دارویی به کار روند.

References

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005 Nov;43(11):5721-32. PubMed PMID: 16272510. Pubmed Central PMCID: PMC1287824. Epub 2005/11/08. eng.
2. Lee J, Yun HS, Cho KW, Oh S, Kim SH, Chun T, et al. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: immune modulation and longevity. *Int J Food Microbiol.* 2011 Aug 2;148(2):80-6. PubMed PMID: 21652104. Epub 2011/06/10. eng.
3. Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life.* 2011 Nov 14;4(4):387-94. PubMed PMID: 22514571. Pubmed Central PMCID: PMC3227153. Epub 2012/04/20. eng.
4. Romani Vestman N. *Lactobacillus* characterization and effects on oral biofilm composition. 2013 Jul:72-9.
5. Zavisic G, Petricevic S, Radulovic Z, Begovic J, Golic N, Topisirovic L, et al. Probiotic features of two oral *Lactobacillus* isolates. *Braz J Microbiol.* 2012 Jan;43(1):418-28. PubMed PMID: 24031847. Pubmed Central PMCID: PMC3768982. Epub 2012/01/01. eng.
6. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol.* 2001 Feb;90(2):172-9. PubMed PMID: 11168719. Epub 2001/02/13. eng.
7. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology-e-book: Expert consult. Online: Elsevier health sciences; 2014.
8. Puri MS, Grover H, Puri N, Dewan A, Gupta A. Use of probiotics for oral health. *Oral Health & Community Dentistry.* 2011;5:149-52.
9. Bosch M, Nart J, Audivert S, Bonachera MA, Alemany AS, Fuentes MC, et al. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. *Arch Oral Biol.* 2012 May;57(5):539-49. PubMed PMID: 22054727. Epub 2011/11/08. eng.
10. Nomoto K. Prevention of infections by probiotics. *Journal of bioscience and bioengineering.* 2005;100(6):583-92.
11. Jørgensen MR, Keller MK. Use of probiotics in future prevention and treatment of oral infections. *Oral Infections and General Health: Springer;* 2016. p. 125-36.
12. Terai T, Okumura T, Imai S, Nakao M, Yamaji K, Ito M, et al. Screening of Probiotic Candidates in Human Oral Bacteria for the Prevention of Dental Disease. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128657. PubMed PMID: 26053410. Pubmed Central PMCID: PMC4459870. Epub 2015/06/09. eng.
13. Moriya S, Ando Y, Miura H. Trends and prospects of oral health conditions among Japanese: the achievement of 8020. *J Natl Inst Public Health.* 2011;60:379-86.
14. Humphrey LL, Fu R, Buckley DI, Freeman M, Helfand M. Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med.* 2008 Dec;23(12):2079-86. PubMed PMID: 18807098. Pubmed Central PMCID: PMC2596495. Epub 2008/09/23. eng.
15. Teughels W, Durukan A, Ozcelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac MC. Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2013 Nov;40(11):1025-35. PubMed PMID: 24164569. Pubmed Central PMCID: PMC3908359. Epub 2013/10/30. eng.

16. Hartemink R, Domenech V, Rombouts F. LAMVAB—a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J Microbiol Methods*. 1997;29(2):77-84.
17. Sakyi, S.A., et al., Modified DNA Extraction Technique for Use in Resource-Limited Settings: Comparison of Salting Out Methods versus QIAamp Blood Mini Kit. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 2017. 7(3).
18. Bulut, Ç., Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. 2003, İzmir Institute of Technology.
19. RAHMANI S, FOROZANDEH M, MOSAVI M, REZAEE A. Detection of bacteria by amplifying the 16S rRNA gene with universal primers and RFLP. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran (MJIRI)*. 2006;19(4):333-8
20. Tannock G, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Ng J, Munro K, Alatosava T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(9):4264-7.
21. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):897-905. PubMed PMID: 18727656. Epub 2008/08/30. eng.
22. Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:793898. PubMed PMID: 26339142. Pubmed Central PMCID: PMC4539125. Epub 2015/09/05. eng.
23. Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Oh-hashii Y, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)*. 2003;45(1):105-12.
24. WangR, Jiang L, Zhang M, Zhao L, Hao Y, Guo H, et al. The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Sci Rep*. 2017 Mar 10;7:44029. PubMed PMID: 28281568. Pubmed Central PMCID: PMC5345100. Epub 2017/03/11. eng.
25. Tannock GW. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*. 1999;1(1):53-64.
26. Lee HM, Lee Y. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Jun;46(6):676-81. PubMed PMID: 18444977. Epub 2008/05/01. eng.
27. Jayaram P, Chatterjee A, Raghunathan V. Probiotics in the treatment of periodontal disease: A systematic review. *J Indian Soc Periodontol*. 2016 Sep-Oct;20(5):488-95. PubMed PMID: 29242683. Pubmed Central PMCID: PMC5676329. Epub 2016/09/01. eng.
28. Joint F. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. 2002;30
29. Gulati M, Anand V, Jain N, Anand B, Bahuguna R, Govila V, et al. Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. *Int J Prev Med*. 2013 Sep;4(9):988-94. PubMed PMID: 24130938. Pubmed Central PMCID: PMC3793498. Epub 2013/10/17. Eng.

Enayat Kalantar¹, Arghavan Etebarian², Seyed Mahmood Amin Marashi³, Koroush Kabir⁴, Aboozar Moradi⁵, Atefe Shamosi⁶, Tahere Sheshpari⁷

¹ Department of Microbiology, School of medicine, Alborz University Medical Sciences, Karaj, Iran

² Department of oral and maxillofacial pathology, School of dentistry, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

³ Medical Microbiology Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁴ Department of Community Medicine, School of medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁵ Department of Periodontics, Faculty of Dentistry, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁶ Department of Anatomy, School of medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

⁷ Student Research Committee, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Identification of Oral Strains of *Lactobacillus species* in Patients with Chronic Periodontitis and Healthy Individuals

Received: 2 Sep. 2018 ; Accepted: 1 Feb. 2019

Abstract

Background and aim: Chronic periodontitis has been defined as an infectious disease resulting in inflammation within the dental supporting tissue, progressive attachment loss and bone resorption. Nowadays, with increasing microbial resistance, bacterial therapy is an alternative to prevent inflammatory diseases of the oral cavity, which regulates oral microbiota and eliminating pathogenic bacteria. The aim of this study was to identify oral *Lactobacillus* species and in patients with periodontitis and healthy individuals.

Materials & Methods: Use of specific culture medium and restriction fragment-length polymorphism (RFLP) analysis was applied to characterize oral *Lactobacillus* spp in oral cavity samples (saliva, tongue, gingival plaque) from 59 healthy subjects and 59 patients with chronic periodontitis. The 16srDNA genes of *Lactobacillus* spp in samples were amplified by PCR with universal primers. Sequencing performed to confirm the species.

Results: Out Of 354 examined isolates, 254 isolates were positive for *Lactobacillus* based on culture and PCR results. From obtained strain cutting patterns analysis of the oral *Lactobacillus* community, were aggregated into ten different species. *L.paracasei*, *L.fermentum* patient and *L.casei*, *L.plantarum* were the most predominant species in control groups.

Conclusion: The frequency of *Lactobacillus* in patients with periodontitis was significantly reduced comparing to the control group, especially in gingival plaque samples. The difference in the frequency of isolated *Lactobacillus* in the total sample of patients was 8% less than control subjects. There is increasing evidence that the use of existing *Lactobacillus* strains can prevent chronic periodontitis. These probiotic candidates can be selected for the purpose of bacteriotherapy, dairy manufacture and pharmaceutical use.

Keywords: Chronic periodontitis disease, 16SrDNA RFLP-PCR, Oral strains *Lactobacillus* spp

***Corresponding Author:**
Student Research Committee,
Alborz University of Medical
Sciences, Karaj, Iran

Tel: 09192602089
E-mail: tata.sh800@gmail.com