ارزیابی اثر ضد میکروبی کلرهگزیدین و اوژنول بر روی سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم استرپتوکوکوسهای ویریدانس جدا شده از پلاکهای دندانی

حمیده مبارک زاده[۱]، جواد حامدی[۲و۳*]، ستاره حقیقت[۴]

[۱]کارشناس ارشد، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]استاد، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۳] استاد، کلکسیون میکروارگانیسمهای دانشگاه تهران، مرکز پژوهشی فناوریها و فراورده های میکروبی دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۴]استادیار، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ارائه مقاله : ۹۵/۱۱/۱۶ – تاریخ پذیرش : ۹۶/۱۱/۲۸

Evaluation of the Antimicrobial Activity of Chlorhexidine and Eugenol on Planktonic and Biofilm-producing Viridans Group Streptococci Isolated from Dental Plaques

Hamideh Mobarakzadeh[1]- Javad Hamedi[2,3*]- Setareh Haghighat[4]

[1]Master of Science, Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran

[3]Professor, Microorganisms Collection, Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran

[4]Assistant Professor, Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: February 2017; Accepted: 17 February 2018

Introduction: Viridnas streptococci are among the factors involved in dental caries and the subsequent diseases due to their ability in biofilm formation and the synthesis of extracellular polymers. Considering the difference in the resistance of biofilm forms and plankton pathogenic bacteria to bactericide agents, we aimed to compare the effect of chlorhexidine mouthwash and eugenol on planktonic and biofilm forms of viridnas streptococci to find the effective concentrations of the two products.

Materials and Methods: Viridans streptococci were isolated from 20 human dental plaque samples using biochemical tests. The strain with the highest biofilm formation activity was identified more precisely using 16SrRNA gene analysis. The effects of chlorhexidine (0.06-0.2 w/v%) and eugenol (29.7-99 w/v%) were assessed on the planktonic and biofilm cells of the isolated viridans streptococci using macrodilution broth and polystyrene microplates, respectively. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) of these antiseptics on the isolated viridans streptococci was determined.

Results: Strain UTMC 2446 with 98.04% similarity to *Streptococcus sanguinis* had the highest biofilm production ability. The 0.2% and 99% concentrations of chlorhexidine and eugenol inhibited biofilm formation, respectively, while these compounds could effectively inhibit planktonic cell growth at the 0.14% and 79.2% concentrations, respectively.

Conclusion: For the tested compounds, the effective concentrations needed to inhibit biofilm formation were higher than those required for planktonic growth arrest. Moreover, due the possibility of emergence of resistant strains, as well as the fact that the required concentration is equal to the maximum concentration of the compounds in commercial products, their antimicrobial potential must be regularly monitored. Our findings can be beneficial for manufacturing and quality control facilities.

Keywords: Viridans streptococci, *Streptococcus sanguinis*, Biofilm, Chlorhexidine, Eugenol.

***Corresponding Author: jhamedi@ut.ac.ir**

J Mash Dent Sch 2018; 42(1): 75-86.

چکیده

مقدمه: استرپتوکوکهای دهانی با سنتز پلیمرهای خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح دندانی از عوامل پوسیدگی دندان و بیماریهای متعاقب آن هستند. نظر به تفاوت مقاومت اشکال بیوفیلم و پلانکتونی باکتری‌های بیماری زا در برابر عوامل باکتریوسید، مطالعه کنونی با هدف بررسی میزان اثر بخشی دهانشویه کلرهگزیدین و بیوسید اوژنول بر روی سلولهای بیوفیلم و پلانکتونیک استرپتوکوکهای دهانی انجام شده است.

---

*مولف مسؤول، نشانی: تهران، دانشگاه تهران، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، تلفن: ۶۱۱۱۳۵۵۶-۰۲۱

E-mail: jhamedi@ut.ac.ir

مواد و روشها: از ۲۰ نمونه پلاک دندانی انسانی و بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی، تعدادی جدایه‌های *استرپتوکوکوس ویریدانس* جدا شد. جدایه دارای بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم انتخاب و با استفاده از آنالیز ژن **16SrRNA** مورد شناسایی دقیقتر قرار گرفت. میزان اثربخشی غلظتهای مختلف کلرهگزیدین با درصد وزنی/حجمی (۰/۲– ۰/۰۶) و (۹۹ - ۲۹/۷) بر روی رشد سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم این سویه استرپتوکوک دهانی به ترتیب به روشهای ماکرودایلوشن براث و میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) این آنتی سپتیکها بر روی استرپتوکوکوس ویریدانس فوق سنجیده شد.

یافته‌ها: جدایه **UTMC 2446** که ۹۸/۴۰٪ شباهت به استرپتوکوک سانژیوس داشته، بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم را در بین جدایه‌ها داشت. غلظتهای ۰/۲ ٪ کلرهگزیدین و ۹۹٪ اوژنول مانع از تشکیل بیوفیلم در این جدایه شد؛ در حالی که این ترکیبات به ترتیب در غلظتهای ۰/۱۴ و ۰/۰۷۹/۲ به خوبی قادر به مهار رشد سلولهای پلانکتونی بوده‌اند.

نتیجه گیری: برای از بین بردن بیوفیلم استرپتوکوکهای ویریدانس به غلظتی بیش از غلظت مورد نیاز برای مهار رشد سلولهای پلانکتونیک آنها نیاز است. همچنین با توجه به اینکه در این پژوهش، غلظتهای موثر کلرهگزیدین و اوژنول برای مهار رشد بیوفیلم استرپتوکوکهای دهانی معادل حداکثر غلظت این ترکیبات در محصولات تجاری است و نیز با توجه به احتمال بروز سویه های مقاوم، اثربخشی محصولات تجاری باید به صورت دوره‌ای پایش شود. نتایج این پژوهش می‌تواند برای بخشهای تولید و کنترل کیفی این محصولات در واحدهای تولید کننده مفید باشد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس های ویریدانس*، بیوفیلم، کلرهگزیدین، اوژنول،*استرپتوکوکوس سنگوئینیس*.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۷ دوره ۴۲ / شماره ۱ : ۸۶-۷۵ .

مقدمه

پلاک دندانی شامل بیوفیلم یا توده باکتری‌هایی است که بر سطوح دهان شامل سطح دندان‌ها و لثه رشد می‌کند. این لایه چسبناک ابتدا بیرنگ بوده ولی بعداً به صورت کرمی یا قهوه ای رنگ دیده می‌شود.[۱] تقریباً ۸۰ تا ۹۰ درصد وزن پلاک از آب تشکیل شده است، ولی ۷۰ درصد وزن خشک آن از باکتریها و بقیه آن از پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها تشکیل شده است.[۲]. استرپتوکوکوس‌های گروه ویریدانس اولین گروه تشکیل دهنده بیوفیلم در دندان هستند.[۳] این باکتری‌ها شامل یک گروه نامتجانس از گونه‌های استرپتوکوک بوده که ساکن طبیعی حفره دهانی و نیز بخش فوقانی دستگاه تنفسی، مجاری گوارشی و واژن هستند. اگر چه این باکتری‌ها معمولاً بیماری‌زایی کمی دارند، ولی با سندرم‌های بالینی مهمی همراه بوده و از عوامل اصلی اند و کاردیت‌های حاد باکتریایی هستند که پس از دستکاری‌های دندانپزشکی و جراحی‌های دندان و لثه ایجاد می‌شود. همچنین این باکتریها از عوامل اصلی مرگ و میر ناشی از عفونت خون، شوک و سندرمهای تنفسی در بیماران نوتروپنی هستند.[۴] استرپتوکوکوس موتانس مهمترین عضو استرپتوکوکهای ویریدانس است. از دیگر اعضای این گروه می‌توان استرپتوکوک سنگوئینیس را نام برد که بر تشکیل پلاکهای دندانی موثر است. این باکتریها در حفره دهانی افراد سالم یافت شده و می‌تواند شرایط را برای رشد و سکونت میکروارگانیسمهای دیگر عامل عفونتهای دندانی مانند استرپتوکوک موتانس فراهم کند. در صورت ورود به خون، این میکروارگانیسمها می‌توانند سبب اندوکاردیت نیز بشوند.[۵،۶] به همین دلیل مقابله با این میکروارگانیسمها می‌تواند سبب افزایش کیفیت زندگی و بهبود وضعیت سلامت شود. به این منظور، امروزه مواد ضدمیکروبی متفاوتی در بازار عرضه شده است که کاربردهای گوناگونی را در بهداشت دهان

و دندان و دندانپزشکی دارند.[۷] با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عوامل ضدمیکروبی و درک تغییرات مقاومت میکروارگانیسمهای هدف، در گذر زمان می‌توان به کنترل و درمان بیماریهای پریودنتال و عفونتهای ناشی از آن کمک کرد. کلرهگزیدین در سال ۱۹٤۰ در صنایع شیمیایی سلطنتی انگلستان (ICI) در هنگام سنتز ترکیبات ضدمالاریایی کشف شده است. مشتق دی گلوکونات این ترکیب در سال ۱۹٥٤ به عنوان ترکیب آنتی‌سپتیک تجاری موضعی عرضه شده است.[۸] از آن زمان به بعد کاربردهای بسیار متنوعی از این ترکیب در عرضه ابزارآلات پزشکی مانند صابون، دهان شویه، ایمپلنت، لباسهای یک بار مصرف، کاتتر و ژل روان کننده برای تزریق سوند عرضه شده است. اوژنول یک ترکیب فنیل پروفن و از دسته ترکیبات فنیل پروپانوئیدها است. این ترکیب کمی زردرنگ و یکی از اسانسهای روغنی گیاهان میخک، دارچین، جوزهندی و برگ بو است. این ترکیب به عنوان عطر، مواد معطره و اسانس روغنی استفاده می‌شود. نمک روی این ترکیب به عنوان ترکیب آنتی سپتیک و آرام کننده موضعی درد در پانسمان دندان مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۹]

با توجه به فقدان مطالعات پیشین، هدف این مطالعه، مقایسه میزان اثر بخشی کلرهگزیدین و اوژنول به عنوان یکی از پرکاربردترین ترکیبات آنتی‌سپتیک دهانی بر اشکال بیوفیلمی و پلانکتونی سویه‌های استرپتوکوکهای ویریدانس جداشده از دهان افراد سالم، بود.

مواد و روشها

تعداد ۲۰ نمونه پلاک دندانی از ۲۰ فرد متفاوت با استفاده از سواب استریل برداشته شد و هر کدام به محیط ترانسپورت حاوی PBS در pH ۷/۲ انتقال داده شد و هر کدام از نمونه ها برای جدا سازی استرپتوکوکهای ویریدانس بر روی پلیت حاوی محیط تریپتیکاز سوی آگار (Merck) تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور و اتمسفر ۱۰ درصد CO_2 و در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد.[۱۰] شناسایی جدایه ها بر اساس آزمونهای استاندارد شامل شکل کلونی، فعالیت همولیتیک، رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز، رشد در نمک ٦/٥ درصد، هیدرولیز اسکولین، تجزیه قندهای لاکتوز، مانیتول، سوربیتول، رافینوز، اینولین، تست MR-VP و هیدرولیز اوره انجام شد.[۱۱]

از میان ۱٦ جدایه استرپتوکوک دهانی به دست آمده، دو جدایه که سرعت رشد بیشتری داشتند، جهت بررسی تشکیل بیوفیلم میکروبی انتخاب گردید و آزمونهای بهینه سازی محیط کشت و میزان تلقیح به منظور انتخاب سویه‌ای با توانایی برتر تولید بیوفیلم انجام شد. کلونیهای تک کشت خالص سویه‌های استرپتوکوک‌های ویریدانس جدا شده در محیط‌های Mueller Hinton Agar-MHA خون‌دار (Merck) و MHA به علاوه ۵٪ گلوکز و سوکروز (Merck) کشت شد و سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری در طول موج ٦۳۰ نانومتر (OD_{630}) ۰/۱ – ۰/۲ – ۰/۳ تهیه شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محیط‌های کشت MHA خون‌دار (Merck) و Mueller Hinton

Broth-MHB به علاوه ۰٫۵ گلوکز و سوکروز (Merck) در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استرپتوکوکهای دهانی هر نمونه به هر یک از ۶ چاهک در دو ردیف سه تایی ریخته شد. به عنوان شاهد از ۵۰ میکرولیتر محیط MHB خون‌دار (Merck) و MHB به علاوه ۰٫۵ گلوکز و سوکروز (Merck) در دو ردیف سه‌تایی استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. سپس محتویات چاهکها به آرامی تخلیه شده و با سرم فیزیولوژی به آهستگی شستشو داده شد. به منظور تثبیت بیوفیلم تشکیل شده به هر چاهک، ۲۰۰ میکرولیتر متانول خالص افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از تخلیه محتوی چاهک، به میزان ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰٫۵ افزوده شد و به مدت بیست دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از تخلیه رنگ و شستشو، اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ حجمی افزوده شد و پس از بیست دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق با کمک دستگاه میکروپلیت ریدر جذب هر چاهک در طول موج ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید[۱۲] هر آزمون دوبار تکرار شد. پس از بررسی، سویه مناسب با جذب نوری بالا انتخاب شد.

شناسایی نهایی سویه منتخب دارای توان برتر در تولید بیوفیلم به روش مولکولی با آنالیز ژن 16S rRNA انجام شد. به این منظور جدایه منتخب در محیط BHI broth به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس بیوماس باکتری با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته و از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست توده منجمد شده با ازت مایع سلولها شکسته شده و DNA آن با روش استخراج با روش فنل- کلروفرم جداسازی شد. تکثیر DNA با پرایمرهای عمومی 9F (AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG) و 1541R (AGG AGG TGA TCC AAC CGC A) انجام شد.[۱۳]. بررسی محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ صورت گرفت. محصول به دست آمده بعد از خالص سازی، در صورت مناسب بودن باندها برای توالی‌یابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند. جهت بررسی اثر مواد ضدمیکروبی بر روی سلولهای بیوفیلم، ابتدا رقتهای متوالی از مواد ضدمیکروبی مورد آزمون و محیط کشت میکروبی MHB خون‌دار (Merck) تهیه و ۲۵۰ میکرولیتر از این رقتها به صورت دوتایی به چاهکهای میکروپلیت اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۲ در طول موج ۶۵۰ نانومتر به هر چاهک اضافه شد. سایر شرایط ارزیابی تشکیل بیوفیلم مانند آن چه که در بالا گفته شد، بوده است.

به منظور بررسی حداقل غلظت مهارکننده(MIC) مواد ضدمیکروبی، درصدهای وزنی/حجمی(۰/۲– ۰/۰۶) از کلرهگزیدین (شرکت شهردارو، تهران، ایران) و غلظتهای (۰/۹۹–۷۹/۲) درصد وزنی/حجمی از اوژنول ۹۹٪ (Grodab Chemie, Germany) در محیط MHB خون‌دار تهیه گردید. سپس ۲٫۵ میلی‌لیتر از رقتهای تهیه

شده به لوله‌های شیشه‌ای ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۲ به هر لوله اضافه شد. آزمون بر اساس روش میکرودایلوشن براث پروتکل NCCLS انجام پذیرفت.[۱۴] پس از مواجه با مواد ضدمیکربی و طی شدن دوره انکوباسیون، وجود سلولهای زنده به روش میکروسکوپی و کشت بر روی محیط Blood Agar بررسی شد.

یافته ها نتایج حاصل از کشت اولیه نمونه‌های دندانی از ۲۰ فرد مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج آزمونهای بیوشیمیایی و مورفولوژی، از تعداد ۴۸ جدایه رشد کرده بر روی محیط TSA، ۱۶ جدایه متعلق به استرپتوکوکوس‌های ویردانس و ۳۲ جدایه مربوط به باکتریهای دیگر بوده است. فراوانترین جدایه‌های غیراسترپتوکوک ویردانس به ترتیب استافیلوکوک اپیدرمیدیس، استرپتوکوکهای گروه D، *E. coli* و دیفتروئیدها بودند.

جدول۱. نتایج جدایه های کشت نمونه‌های بیوفیلم دندانی بر روی محیط تریپتیکاز سوی آگار

کد آزمایشگاهی	جنس	سن (سال)	سویه های تعیین شده با روش‌های شیمیایی به همراه کد آزمایشگاهی سویه		
A	مرد	۳۵	*Streptococcus mutans* A1	*Staphylococcus epidermidis* A2	*Diphtheroid* A3
B	مرد	۳۱	*Staphylococcus epidermidis* B1	*Streptococcus sanguinis* B2	
C	مرد	۳۲	*Staphylococcus epidermidis* C1	*Streptococcus mutans* C2	
D	مرد	۳۵	*Streptococcus mutans* D1	*E coli* D2	
E	مرد	۴۰	*E. coli* E1	*Streptococcus parasanguinis* E2	
F	مرد	۳۰	*Staphylococcus epidermidis* F1	*Streptococcus group* D F2	*E. coli* F3
G	مرد	۳۰	*Streptococcus mutans* G1	*Diphtheroid* G2	
H	مرد	۳۲	*Staphylococcus saprophyticus* H1	*Diphtheroid* H2	*Staphylococcus epidermidis* H3
I	مرد	۳۲	*Staphylococcus epidermidis* I1	*Streptococcus sanguinis* I2	
J	مرد	۳۹	*Streptococcus mutans* J1	*E. coli* J2	*Streptococcus group D* J3
K	زن	۳۱	*Streptococcus mutans* K1	*Streptococcus group D* K2	*Staphylococcus epidermidis* K3
L	زن	۳۲	*Staphylococcus epidermidis* L1	*Streptococcus mutans* L2	
M	زن	۳۰	*Streptococcus sanguinis* M1	*Staphylococcus saprophyticus* M2	
N	زن	۳۸	*Streptococcus mutans* N1	*Streptococcus parasanguinis* N2	*Staphylococcus epidermidis* N3
O	زن	۴۰	*Staphylococcus epidermidis* O1	*Diphtheroid* O2	
P	زن	۴۰	*Staphylococcus epidermidis* P1	*Streptococcus sanguinis* P2	
Q	زن	۳۸	*Staphylococcus epidermidis* Q1	*Diphtheroid* Q2	
R	زن	۳۷	*Streptococcus group D* R1	*Streptococcus mutans* R2	
S	زن	۳۸	*Streptococcus sanguinis* S1	*Staphylococcus epidermidis* S2	*Diphtheroid* S3

در جدول۲، نتایج آزمونهای بیوشیمیایی بر روی ۱۶ جدایه استرپتوکوک ویریدانس آورده شده است. این جدایه‌ها در سه گونه ***S. mutans*** (شامل ۹ جدایه)، ***S. sanguinis*** (شامل۵ جدایه) و ***S. parasanguinis*** (شامل ۲ جدایه) طبقه بندی شده‌اند.

جدول۲. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی ۱۶ جدایه استرپتوکوک ویریدانس

سویه پیشنهادی	تولید اسید از			لاکتوز	تولید اوره آز	تولید استوئین	تجزیه اسکولین	نوع همولیز	کد جدایه
	سوربیتول	اینولین	مانیتول						
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	A1
Streptococcus sanguinis	-	_	-	+	-	-	+	α	B2
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	C2
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	D1
Streptococcus parasanguinis	-	_	-	+	-	-	-	α	E2
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	G1
Streptococcus sanguinis	-	_	-	+	-	-	+	α	I2
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	J1
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	K1
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	α	L2
Streptococcus sanguinis	-	_	-	+	-	-	+	α	M1
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	γ	N1
Streptococcus parasanguinis	-	_	-	+	-	-	-	α	N2
Streptococcus sanguinis	-	_	-	+	-	-	+	α	P2
Streptococcus mutans	+	+	+	+	-	+	+	γ	R2
Streptococcus sanguinis	-	_	-	+	-	+	+	α	S1

از بین جدایه های مختلف استرپتوکوک ویریدانس، دو جدایه A1 و B2 که سرعت رشد بیشتری داشتند، برای ارزیابی میزان فعالیت بیشتر بیوفیلم انتخاب شدند. با توجه به ارزیابی نتایج آزمونهای توانایی تشکیل بیوفیلم، که در جدول ۳ نشان داده شده است، سویه B2 و محیط کشت مولر هینتون براث همراه ۵٪ خون و میزان تلقیح (۰/۲ OD) برای ادامه کار انتخاب شد.

جدول۳. نتایج بهینه سازی میزان تشکیل بیوفیلم بر اساس ترکیب محیط کشت و میزان تلقیح

سویه منتخب	محیط کشت	میزان تلقیح	میزان بیوفیلم (OD)	انحراف معیار
A1	Muller Hinton broth + خون ۵٪	۰,۱	۰,۵۴۲	۰,۰۲
		۰,۲	۰,۶۹۵	۰,۰۳
		۰,۳	۰,۸۳۵	۰,۰۴
	Muller Hinton broth +گلوکز وسوکروز ۵٪	۰,۱	۰,۳۵۶	۰,۰۲
		۰,۲	۰,۴۲۵	۰,۰۲
		۰,۳	۰,۵۲۳	۰,۰۳
B2	Muller Hinton broth + خون ۵٪	۰,۱	۰,۶۳۵	۰,۰۳
		۰,۲	۰,۸۴۶	۰,۰۲
		۰,۳	۱,۴۹	۰,۰۴
	Muller Hinton broth +گلوکز وسوکروز ۵٪	۰,۱	۰,۳۷۸	۰,۰۲
		۰,۲	۰,۴۸۰	۰,۰۲
		۰,۳	۰,۵۱۰	۰,۰۳

نتیجه شناسایی مولکولی به روش PCR ژن 16SrRNA بر روی سویه منتخب دارای بیشترین توانمندی تولید بیوفیلم (B2)، تاییدکننده ویریدانس بودن جدایه بود. بر اساس این نتایج، این سویه متعلق به جنس استرپتوکوکوس بود و بیشترین شباهت (٪۹۸,۰۴) را با گونه *S. sanguinis* داشت. این سویه با کد UTMC 2446 در کلکسیون میکروارگانیسمهای دانشگاه تهران نگهداری و ذخیره شده است.

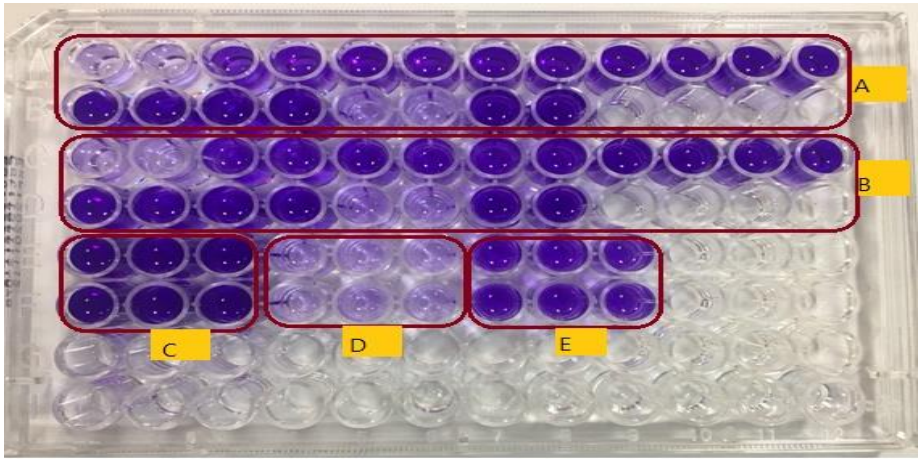
نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی دهانشویه کلرهگزیدین بر بیوفیلم و سلولهای پلانکتونی *S. sanguinis* UTMC 2446 در شکل ۱ و جدول ٤ آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود حداقل

غلظت مهارکنندگی سلولهای پلانکتونیک و بیوفیلم جدایه منتخب در مقابل این ترکیب به ترتیب ۰/۱٤ g/100ml و ۰/۲g/100ml بود. همچنین نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی ماده ضدعفونی کننده اوژنول نشان داد، حداقل غلظت مهارکنندگی سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم *S. sanguinis* UTMC 2446 در مقابل این ترکیب، به ترتیب ٪۷۹/۲ و ۹۹٪ بود.

جدول٤. مقایسه حداقل غلظت مهار کننده رشد(MIC) برای کلرهگزیدین و اوژنول علیه سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم *S. sanguinis* UTMC 2446 جدا شده از دهان

	کلرهگزیدین									اوژنول								
	۰/۱۸	۰/۱٦	۰/۱٤	۰/۱۲	۰/۱	۰/۰۸	۰/۰٦	۰/۰۹۹	۸۹/۱	۷۹/۲	٦۹/۳	٥۹/٤	٤۹/٥	۳۹/٦	۲۹/۷
بیوفیلم	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
پلانکتونی	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

(+) رشد میکروبی، (–) عدم رشد میکروب



شکل۱. ارزیابی میزان تاثیر کلرهگزیدین و اوژنول بر سلولهای بیوفیلم و پلانکتونی *S. sanguinis* UTMC 2446 جدا شده از دهان.

A: بررسی اثرکلرهگزیدین بر *S. sanguinis* به ترتیب از چپ به راست غلظتهای ۰/۲– ۰/۱۸ – ۰/۱٦ – ۰/۱٤ –۰– ۰/۱۲ –۰– ۰/۱– ۰– ۰/۸ –۰– ۰/٦ W/V٪ درصد وزنی/حجمی– شاهد منفی (محیط کشت)– شاهد مثبت (باکتری ومحیط کشت) به صورت دوتایی. **B**: بررسی اثر اوژنول بر *S. sanguinis* به ترتیب از چپ به راست غلظتهای ۹۹– ۸۹/۱– ۷۹/۲– ٦۹/۳– ٥۹/٤– ٤۹/٥– ۳۹/٦– ۲۹/۷ ٪– شاهد منفی (محیط کشت)– شاهد مثبت (باکتری ومحیط کشت) به صورت دوتایی. **C**: بررسی تشکیل بیوفیلم میکروبی *S. sanguinis* در محیط مولر هینتون براث خون دار به همراه سوپرناتانت با OD:۰/۲ **D**: شاهد منفی تشکیل بیوفیلم میکروبی (محیط کشت). **E**: بررسی تشکیل بیوفیلم میکروبی *S. sanguinis* در محیط مولر هینتون براث با سوکروز و گلوکز ٥٪ به همراه سوپرناتانت OD: ۰/۲ .

بحث

گزارشهای متعدد نشان می‌دهد که اوژنول و کلرهگزیدین کارایی مناسبی برای ضدعفونی کردن دندان و جلوگیری از عفونتهای پریودنتال دارند.[۱۵،۱۶]. در این گزارش‌ها نشان داده شده که تاثیر اوژنول بر استرپتوکوکهای دهانی محدود بوده است. در اغلب پژوهش‌های انجام شده اثرات ضد میکروبی بیوسایدها بر روی فرم پلانکتونی استرپتوکوکهای ویریدانس مورد بررسی قرار گرفته است، حال آن شکل پلانکتونی در زندگی میکروبی اهمیت بالینی محدودی دارد و بدن ما در اغلب موارد با سلولهاای بیوفیلم میکروبی مواجه است. بی‌توجهی به این شکل زندگی سبب اختلال در روند پیشگیری و درمان می‌گردد.[۱۷] مهمترین یافته پژوهش کنونی این است که جهت ممانعت از رشد *S. sanguinis* در حالت بیوفیلم کلرهگزیدین در غلظت ۰/۲ g/100ml و اوژنول دردرجه خلوص ۹۹٪ ضروری است، ولی این ترکیبات بر روی سلولهای پلانکتونی به ترتیب با غلظت ۰/۱٤ g/100ml و ۷۹/۲٪ اثربخش بوده اند. از سوی دیگر اغلب پژوهشهای پیشین بر روی نمونه‌های کلکسیونی صورت گرفته است.[۱۵و۱۸-۲۳] و پژوهشهای معدودی بر روی سویه‌های استرپتوکوک ویریدانس بالینی انجام شده است.[۱۶و۲٤-۲٦] با این وجود پژوهشی که در آن اثربخشی این دو ترکیب بر روی سلولهای بیوفیلمی و پلانکتونی با منشاء بالینی مقایسه شود، دیده نشده است.

حقیقی و همکارانش[۱٦] مقایسه اثرات ضد میکروبی ده گونه گیاهی را با کلرهگزیدین بر علیه *Streptococcus mutans*، *Candida albicans* و *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* مقایسه کردند و نشان دادند که عصاره گیاهی تاثیر مناسبی بر باکتریهای مورد آزمایش در مقایسه با دهان شویه کلرهگزیدین دارد.[۱٦] یاقوتی خراسانی و همکارانش[۱۵] اثر دو دهانشویه تیمول و کلرهگزیدین را بر علیه *S. mutans* و *S. sanguinis* تهیه شده از کلکسیون میکروبی بررسی کردند که هر دو دهانشویه در حذف باکتریها بخصوص *S. sanguinis* اثر داشته اند. در مطالعات دیگری اثر اوژنول بر بیوفیلم *C. albicans* مورد بررسی قرارگرفته است در این مطالعه اوژنول با غلظت ۵۰۰ mg/l بر بیوفیلم مخمر موثر بوده است.[۲۷] حسینی و همکاران[۲٤] اثر عوامل ضدمیکروبی بر سلولهای پلانکتونی و بیوفیلم *S. mutans* جدا شده از نمونه های بالینی را بررسی کردند و نتایج بررسی نشان داد برای ریشه کنی بیوفیلم غلظت ۰/۲ g/100ml از کلرهگزیدین و در مورد سلولهای پلانکتونی غلظت ۰/۰۹۵ g/100ml مناسب است.[۲٤] نتایج این تحقیق در مورد سلولهای بیوفیلم استرپتوکوکهای ویریدانس با نتایج تحقیق حاضر منطبق است، اما بر اساس نتایج این پژوهش برای حذف سلولهای پلانکتونی این باکتریها غلظت بالاتری از کلرهگزیدین به نسبت پژوهشهای پیشین مورد نیاز است. همچنین مطالعاتی توسط Didry و همکاران[۱۹] در خصوص استفاده توام از ماده ضدعفونی کننده اوژنول و آنتی سپتیکهای تیمول و کارواکرول انجام شده که نشان

داد اوژنول به تنهایی و به صورت توام با این مواد خاصیت ضدعفونی کنندگی خود را حفظ می‌کند. در مطالعاتی که توسط ابراهیمی کهریز سنگی و همکاران[۲۸] بر روی اثر کلرهگزیدین بر عفونتهای بیمارستانی انجام شد نتایج نشان داد که استفاده از کلرهگزیدین در غلظتهای مناسب (MIC) می تواند از تشکیل بیوفیلم در گونه های مختلف باکتریهای عامل عفونتهای بیمارستانی جلوگیری کند، اما دوزهایی از کلرهگزیدین که کمتر از MIC هستند می‌توانند محرک تولید بیوفیلم باشند.

باتوجه به اینکه تاکنون تحقیقی در مورد مقایسه اثر اوژنول بر روی فرم پلانکتونی و بیوفیلم باکتریهای دهانی صورت نگرفته، مقایسه نتایج حاصل با تحقیقات دیگران میسر نمی باشد، زیرا سایر مطالعات انجام شده فقط بر روی فرم پلانکتونی استرپتوکوکهای دهانی بوده است.[۲۱- ۹و۹]

در پژوهش حاضر اثر مهارکنندگی رشد رقتهای مختلف دهان شویه پرکاربرد کلرهگزیدین ۰,۲ درصد و اوژینول خالص که به طور گسترده در دندانپزشکی مورد استفاده قرارمی گیرد، بر روی سلولهای بیوفیلم و پلانکتونی ***S. sanguinis*** مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج حاصل از این مطالعه چنین بر می آید که دهان شویه کلرهگزیدین درغلظت g/100ml ۰/۲ و اوژنول در درجه خلوص ۹۹٪ توانایی مهار رشد سلولهای بیوفیلم ***S. sanguinis*** را دارند. در حالی که در سلولهای پلانکتونی این باکتری کلرهگزیدین در غلظت g/100ml ۰/۱٤ و اوژنول در غلظت ۷۹/۲٪ توانایی مهار رشد دارد. به علت نفوذ کمتر آنتی بیوتیک در درون بیوفیلم و نیز تغییرات ژنتیکی و متابولیکی و ماتریکس خارج سلولی، سلولهای بیوفیلم مقاومت بیشتری نسبت به مواد ضدمیکروبی در مقایسه با سلولهای پلانکتونی دارند.[۲۳]

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، لزوم دقت در واحدهای کنترل کیفی ترکیبات آنتی سپتیک برای کلرهگزیدین در غلظت g/100ml ۰/۲ و اوژنول در درجه خلوص ۹۹٪ بسیار ضروری به نظر می رسد. اهمیت این نکته با توجه به اینکه این غلظتها، معادل با غلظت این ترکیبات در فراورده های تجاری است، بیشتر می شود. به عبارت دیگر در صورت بروز یک جهش احتمالی و بروز مقاومت در استرپتوکوکهای دهانی، ترکیبات تجاری حاوی غلظت کمتری برای کشندگی استرپتوکوکهای ویریدانس خواهد بود، که همانگونه که در بالا گفته شد، می‌تواند سبب بروز مقاومت بیشتر شود. بنابراین پایش مجدد و دوره ای این ترکیبات ضدعفونی کننده از نظر عملکرد و درک میزان مقاومت برای جلوگیری از شیوع عفونت های پریودنتال توصیه می‌شود. انجام آزمایش و ارزیابی اثر در شرایط بالینی می تواند سبب کارآمدی فراتر نتایج پژوهش کنونی بشود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از خانمها فائزه الماسی، فهیمه محمدنیا و لیلا پرویزی که نقش شایانی در پیشبرد این مطالعه داشته اند، تقدیر و تشکر می کنند.

منابع

1. Oh J S, Shim J J, Lee K S, Doh J W. Cervical epidural abscess: Rare complication of bacterial endocarditis with Streptococcus viridans: A case report. Korean J Spine 2015;12(1):22-5.
2. Marsh P, Bradshaw D. Dental plaque as a biofilm. J Industrial Microbiol 1995;15(3):169-75.
3. .Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems 1. Annu Rev Microbiol. 2000;54(1):413-37.
4. Darby ML, Walsh M. Dental Hygiene: Theory and Practice. 2nd ed. *Philadelphia: W.B, Saunders* Co; 2010. P.21-2.
5. Wadström T, Eliasson I, Holder I, Ljungh Å. Pathogenesis of Wound and Biomaterial-associated Infections. 1st ed. London: Springer-Verlag; 1990. P. 429-35.
6. Takahashi Y, Takashima E, Shimazu K, Yagishita H, Aoba T, Konishi K. Contribution of sialic acid-binding adhesin to pathogenesis of experimental endocarditis caused by *Streptococcus gordonii* DL1. Infect Immun 2006;74(1):740-3.
7. Mozaffari B, Mansouri S, Rajabalian S, Alimardani A, Mohammadi M. In vitro study between antibacterial and cytotoxic effects of chlorhexidine and persica mouthrinses. J Dent Sch 2005;23(3):494-509.
8. Lim K, Kam P. Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. Anaesth Intensive Care. 2008;36(4):502.
9. Jadhav BK, Khandelwal KR, Ketkar AR, Pisal SS. Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. Drug Dev Ind Pharm. 2004;30(2):195-203.
10. Wen ZT, Burne RA. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by Streptococcus mutans. App Environ Microbiol 2002;68(3):1196-203.
11. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes: 2nd ed. New York: Springer - Verlag; 2011. P.694.
12. Welch K, Cai Y, Strømme M. A method for quantitative determination of biofilm viability. J Function Biomater. 2012;3(2):418-31.
13. Kumar V, Bharti A, Gusain O, Bisht GS. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. J Ssci Eng Tech Mat 2010;2:3-10.
14. Wikler M. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard. 5th ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
15. Yaghooti KM, Assar S, Rezahosseini O, Assar R S. Comparison of inhibtory dilutions of a thymol-based mouthwash (Orion Ò) with chlorohexidine on *Streptococcus mutnas* and *Streptococcus sanguis*. J Dent Res J (Isfahan) 2011; 7(2): 122-9.(Persian)
16. Haghighati F, Jafari S, Beyt EJ. Comparison of antimicrobial effects of ten Herbal extracts with chlorhexidine on three different oral pathogens; an in vitro study. Hakim J 2003; 6(3): 71-6. (Persian)
17. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community–implications for health and disease. BMC Oral Health 2006;6(1):S14.
18. Sadeghi R, Owlia P, Rezvani M, Taleghani F, Sharif F. An in-vitro comparison between antimicrobial activity of nanosilver and chlorhexidine against *Streptococus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. J Islam Dent Assoc Iran 2011; 23: 225– 31. (Persian)
19. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. Pharm. Acta Helv 1994;69(1):25-8.
20. Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. J Appl Microbiol. 1998;84(6):1149-55.
21. Rodríguez Luis O, Sánchez Casas RM, Verde Star MJ, Núñez G, Ríos R, Chávez A. Obtaining the essential oil of Syzygium aromaticum, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. J Oral Res 2014;3(4):218-24.
22. Adil M, Singh K, Verma PK, Khan AU. Eugenol-induced suppression of biofilm-forming genes in *Streptococcus mutans*: An approach to inhibit biofilms. J Glob Antimicrob Resist 2014;2(4):286-92.

23. Prabhakar J, Balagopal S, Priya M, Selvi S, Senthilkumar M. Evaluation of antimicrobial efficacy of Triphala (an Indian Ayurvedic herbal formulation) and 0.2% chlorhexidine against *Streptococcus mutans* biofilm formed on tooth substrate: An in vitro study. Indian J Dent Res 2014;25(4):475.

24. Hosseini F, Ghavam Shirazi M, Norouzi J. The effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm strains of *streptococcus mutans* isolated from dental plague. Horizon Med Sci 2011;17(2):5-13.

25. Järvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. In vitro susceptibility of *streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. Antimicrob Agent Chem 1993; 37(5):1158-9.

26. Kulik EM, Waltimo T, Weiger R, Schweizer I, Lenkeit K, Filipuzzi-Jenny E, et al. Development of resistance of mutans streptococci and Porphyromonas gingivalis to chlorhexidine digluconate and amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. Clin Oral Investig 2015;19(6):1547-53.

27. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against Candida albicans biofilms. Mycopathologia 2007;163(3):137-43.

28. .Ebrahimi KAA, Shabanpour Z, Habibiyan S, Hakimi AR, Hemeati M, Aflakiyan F, et al. Chlorohexidine effect on bacterial biofilms isolated from nasocomial infections. BJM 2015; *4*(14): 83-92.