مسح الأنواع البكتيرية المكونة للويحة السنية على أسنان البالغين والأطفال

حوراء وهاب عزيز الكعبي

كلية العلوم للبنات–جامعة بابل

الخلاصة

جمعت 50 عينة لويحة سنية (plaque) خلال مدة الدراسة البالغة سنة (2007) والتي تمت في كلية العلوم للبنات قسمت على 25 عينة من الأطفال و25 عينة من البالغين .عزلت118 عزلة بكتيرية من هذه العينات تبين إن العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام هي السائدة(88.2%) إذ سجلت النسبة الأكبر لبكتيريا *Streptococcus* تلتها بكتريا *Lactobacillus* ثم بكتريا *Staphylococcus* في حين سجلت البكتيريا السالبة لصبغة كرام نسبة 11.8% موزعة بين بكتريا *E.coli* و*E.aerogenes* .

وجد إن هنالك تنوع بكتيري في العينة الواحدة ويشير هذا التنوع إلى تكون الأغشية الرقيقة الحيوية Biofilmعلى الأسنان. كان التنوع البكتيري في عينات البالغين أكثر منه في عينات الأطفال . وضحت النتائج إن بكتريا *Streptococcus* و *Lactobacillus* (45.1% و 28.3% على التوالي) هي السائدة في عينات الأطفال وبنسب اكبر من مثيلاتها في البالغين (34.5% و 25,8% على التوالي). كانت نتائج العد البكتيري الكلي في عينات الأطفال (بمعدل 1.63 ×10^9 cfu\ml\plaque) أكثر من البالغين (بمعدل 1.94 ×10^8 cfu\ml\plaque).

Abstract

Fifty samples of plaque were collected during one year (2007).These samples were divided into 25 samples of children and 25 samples of adult. In this study 118 bacterial isolates were isolated. The results were revealed that Gram positive bacteria were pre dominant (88.2%), *Streptococcus* was prevalence in the first place and then come *Lactobacillus* and *Staphylococcus* in all samples while the Gram negative bacteria was registered 11.8 % (*Escherichia.coli* and *Entrobacter.aerogenes*) in all samples .It was noted that bacterial variety in the single sample and this certain the formation of biofilm on the teeth , this variety in adult samples was larger then in the children samples . *Streptococcus* (45.1%) and *Lactobacillus* (28.3%)were predominant in the children samples and registered high percentage in compared with adult samples (34.5% and25.8% respectively) The result were revealed that Total Bacterial Count (TBC)in children samples (mean 1.63×10^9cfu\ml\plaque) were more than in adult samples(mean 1.94×10^8 cfu\ml\plaque).

المقدمة

يعد التجويف الفموي في الإنسان السليم معقما عند الولادة و تبدأ البكتيريا بالدخول إليه عن طريق التغذية بعد 3–5ايام من الولادة (Davis *et al*, 1990) حتى تصل بعد عدة أشهر إلى أكثر من مليون خلية بكتيرية التي يكون بعضها نبيت طبيعي للفم والبعض الأخر ممرض (Ted and Christine, 1995) تستوطن بعض هذه البكتريا الأسنان مكونة ما يعرف باللويحة السنية (plaque) التي وصفت عام 2002 من قبل Donlan و Costerton بانها عبارة عن غشاء حيوي رقيق ذا صفات وظيفية وتركيبية يصل سمكها إلى 300 –500 خلية بكتيرية(Davis *et al*, 1990) تضم مجتمع ميكروبي متنوع يبقى مستقر نسبيا ولكن بدخول بعض الأنواع الممرضة إليه يعاني من تغيرات مثل إنتاج الحامض العضوي و ينغمر هذا المجتمع الميكروبي في أرضية من السكريات المتعددة ذات المصدر البكتيري و بعض البوليمرات اللعابية. يسمح هذا الغشاء للبكتيريا بالنمو و يعمل كواقي يمنع دخول المضادات البكتيرية إليها وبذلك تقل فعالية علاج الالتهابات التي تصيب اللثة او الاسنان و يضمن لها زيادة الطاقة و انتقال المغذيات (Marsh, 2006 ; Leonard, 2002 ; Wirthlin *etal* , 2003) .

تتكون اللويحة السنية عند حدوث امتزاز لبعض بروتينات اللعاب و بعض مكونات الغذاء والبكتيريا إلى سطح السن بفعل القوى الفيزيائية للعناصر المعدنية في السن و كنتيجة لعملية تحسس النصاب quorum sensingالتي تسيطر على التعبير الجيني للخلايا البكتيرية بالاستجابة لكثافة الخلايا على السن تتوسطها

إشارات خارج خلوية نوعية منتجة من البكتيريا متمثلة بالبيبتيدات الصغيرة المنتجة من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وبمركب كيمياوي يعرف Acylehomoserine Lactones من البكتيريا السالبة لصبغة كرام Camilli (and Bassler 2006);(Wirthlin *etal*, 2003);(Hua *etal* 2000) . تتكون أولا القشرة المتكيفة التي تعاني من تفاعل خفيف مع سطح الخلايا البكتيرية يليه تفاعل قوي تتوسطه جزيئات نوعية ثم يحدث استيطان ثاني للبكتيريا و نمو و إنتاج سكريات متعددة خارج خلوية عن طريق تخمير بقايا الغذاء في الأسنان (Paesleme *etal* 2006 ;Kolenbrander *etal*, 2000 ; John and Lindsay, 2006). تقسم هذه السكريات الخارج خلوية إلى خارجية تلعب دور في أمراضية اللويحة السنية و داخلية تعمل كمصدر داخلي للكاربوهيدرات التى تتايض لإعطاء الحموضة.

بعد اكتمال تكون اللويحة السنية تكون غنية بالأنواع البكتيرية التي غالبا ماتنحسر تدريجيا مع سيادة أنواع قليلة لها القدرة على إنتاج حامض عضوي و خلق بيئة حامضية (5.5 PH) عن طريق تغيير تعبيرها الجيني لزيادة إنتاج الحامض و زيادة إنتاج بروتينات نوعية تحميها من هذه البيئة الحامضية (Loesche,1986 and Welin *etal*,2003). عند هذه المرحلة يحدث عدم توازن بين المواد المكونة للسن و اللويحة السنية ينتج عنه فقدان العناصر المعدنية للسن (Brown *etal* , 2000 ; Marsh , 2006) . أشار Loescheفي عام 1976 إلى الأهمية الامراضية للويحة السنية و صنفها إلى نوعية تعتمد على بعض الأنواع الممرضة المتواجدة فيها وغير نوعية تعتمد على المنتجات الفاسدة التي تنتجها البكتيريا في اللويحة و تسبب التهاب اللثة و التهاب حول السن وتسوس الاسنان(Pratten *etal* , 1998) التي تعد من المشاكل المهمة التي تعاني منها الدول الصناعية الكبرى إذ تصيب الأطفال بنسبة 60–90% و نسبة كبيرة من البالغين (Brown *etal* , 2000) .

ذكر Li وجماعته(2007) إلى إن هناك تنوع بكتيري له القدرة على استيطان أسنان الأطفال و تكوين plaqueو أكد على عدم امكانية زرع كل الأنواع المتواجدة. تحدث الاصابة باللويحة السنية بصورة مبكرة عند الأطفال لعدة أسباب منها الأسنان الحساسة لأسباب وراثية أو إصابة الأم إثناء الحمل بالحمى او قلة التغذية او التدخين او من البكتيريا المنتقلة من ألام آو الأشخاص ذوى الصلة بالاضافة الى عدم تكامل الجهاز المناعي الموضعي (Anne, 2006)وبالتالي تسبب لهم تسوس مبكر و تنخر واضح بسبب الحامض العضوي المنتج منها الذي يذيب العناصر المعدنية من الأسنان ولهذا فان هذه الأسنان تكون حساسه و هشه عند الكبر و هي ظاهرة كثيرة الحدوث عند أطفال الأسر ذات الدخل المحدود (Harris Kidd and Fejershov, 2004 *etal* 2004) .

يتكون المحتوى الميكروبي للويحة السنية من البكتيريا المنتجة للحامض و المتحملة له الموجبة لصبغة كرام مثل (*Streptococcus* *S. mutans* , *S.sanguis* , *S.salivarius* ,*S. mitis and S. mitior*) و *Lactobacillus*و *Enterococcus* التي تسبب إزالة سريعة للمينا عند الأطفال(Loesche,1986) والتي يكون مصدرها الأم أو الأشخاص ذوى الصلة و تكون سائدة في الأطفال (Ted and Christine, 1995 ; Nogueira *etal* 2005; Noguchi *etal* 2005) و بكتيريا *Staphylococcus aureus* . *Staphylococcus epidermides* بالاضافه لأنواع قليلة من البكتيريا السالبة لصبغة كرام مثل *E.coli* , *Enterobacter*(John and Lindsay 2006 و Wirthlin *etal* 2003)

هدفت هذه الدراسة الى عزل الانواع البكتيرية المكونة للويحة السنية على اسنان الاطفال والبالغين والمقارنة بين الاعداد و الانواع المعزولة من الاطفال والبالغين .

المواد وطرائق العمل

***العينات:**

تم جمع 50 عينة لويحة سنية (plaque) من الأشخاص الذين يعانون تكونها على أسنانهم, شملت هذه الدراسة فئات عمرية مختلفة. جمعت العينات بشكل عشوائي من المستشفيات وعيادات طب الاسنان ومن المدارس ومن بعض المتبرعين وتم زرع العينات في كلية العلوم للبنات إذ قسمت العينات بواقع 25عينة plaque معزولة من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 5–15 سنة و 25 عينة معزولة من الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم بين 20–60 سنة .

***طرائق العمل:**

بالاعتماد على ما جاء فيه Ted and Christine ,1995 ; Li *et al* , 2007 تم إجراء مايلى:

1– باستعمال عيدان الأسنان تم إزالة اكبر كمية ممكنة من plaque المتكونة على الاسنان قبل غسلها ووضعت في طبق بلاستيكي (Aebi , 1974 ; Quigley and Hein , 1962)

2– تم عمل التخفيف الأول بإضافة 10 مل من محلول phosphate bufferإلى الطبق البلاستيكي وباستعمال pestle and mortarالمعقمة بالايثانول سحقت العينة مع محلول التخفيف إلى إن تكون عالق متجانس .

3– حضر من العالق فى (2) سلسلة من التخافيف .

4– زرعت العينات باستعمال0.1مل من التخفيف المناسب (الثالث والرابع) بطريقة النشر على الأوساط BHI agar , Blood agar, Mannitol salt Agar , MacConkey agar , Man-Rogosa Sharpe (MRS) agar

5–حضنت الاطباق في ظروف هوائية و ظروف قليلة التهوية Microaerophilic باستعمال الشمع همه الجار An aerobic jar بدرجة 37 م^0 لمدة 24–48 ساعة .

6–بعد الحضن عدت المستعمرات بالنسبة/1 مل / plaque وشخصت البكتيريا النامية بالاعتماد على جداول تشخيصية مذكورة في (2000) Macfaddin

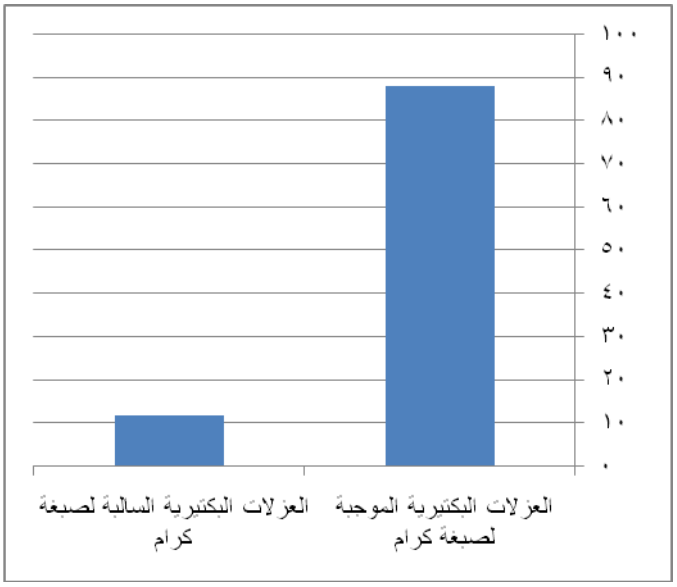
النتائج والمناقشة

***تحديد العزلات البكتيرية المعزولة من عينات اللويحة السنية للبالغين والاطفال**

أشارت نتائج هذه الدراسة إلى تعدد وتنوع العزلات البكتيرية المعزولة من العينة الواحدة مما يؤكد تكون الغشاء الحيوي الرقيق واللويحة السنية على الأسنان.كما إن الظروف المحيطة بالأسنان ليست موحدة لكل الأشخاص وتتحكم بذلك بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية التي تؤثر على المكون ألمكروبي للويحة السنية (Noguchi *etal*,2005; Li *etal*,2007).

عزلت 118 عزلة بكتيرية من 50 عينة plaque (25 عينة أطفال و25 عينة بالغين) قسمت على 60 عزلة من عينات أسنان الأطفال و58 عزلة من أسنان البالغين .أظهرت النتائج إن العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام هي الأكثر تواجد (88.2%) كما هو موضح في شكل 1 وكانت بكتريا *Streptococcus* هي السائدة (39.9%) تلتها بكتريا *Lactobacillus*(27.1%) ثم بكتريا *Staphylococcus* (21.2%) في حين سجلت العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام نسبة11.8% (جدول 1).أكد كل من Huaوجماعته (2000) Li وجماعته (2007) إن بكتريا كرام الموجبة هي السائدة في البالغين والأطفال وبالذات بكتريا *Streptococcus* و*Lactobacillus* .

وجد من النتائج إن التنوع البكتيري في عينات plaque للبالغين أكثر منه في عينات الأطفال وهذا يعود إلى كون الاطفال يتناولون المواد السكرية بكثرة التي تستهلكها بكتريا *Streptococcus*و *Lactobacillus*



شكل 1:النسبة المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة من عينات plaque

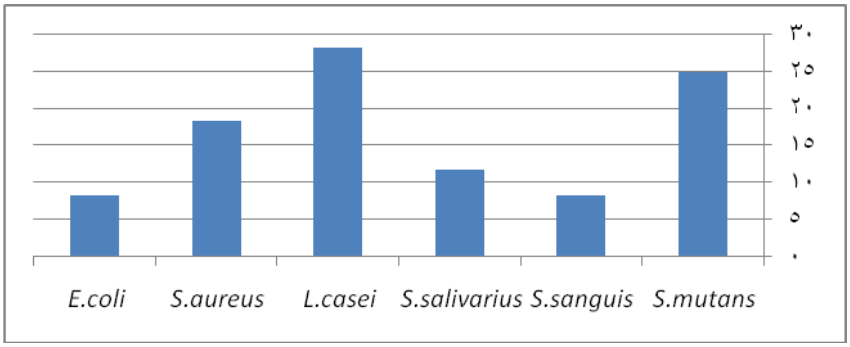
جدول 1: أعداد العزلات البكتيرية المعزولة و نسبها المؤية

الأجناس البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المؤوية
Streptococcus(S.mutans,S.sanguis,S.salivarus,S.mitior)	118:47	39.9
Lactobacillus casei	118:32	27.1
Staphylococcus (S.aureus,S.epidermidis)	118:25	21.2
Escherichia coli	118:11	9.3
Enterobacter aerogenes	118:3	2.5
المجموع	118	100

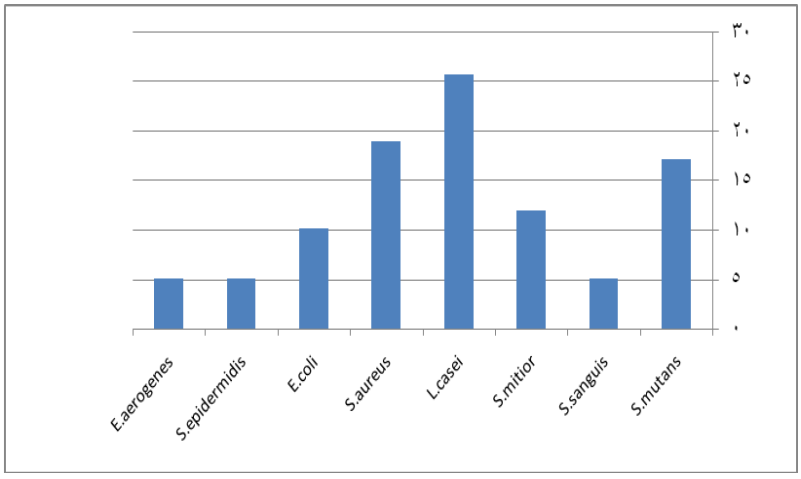
المتواجدة على أسنانهم لتكوين بيئة حامضية تحد من نمو أنواع بكتيرية أخرى (Li *etal*,2007).

أظهرت نتائج زرع عينات الأطفال سيادة بكتـيريا *Streptococcus* (45.1%) وبكتريا *Lactobacillus* بنسبة (28.3%) وطابقت هذه النتيجة ما ورد في Desoet وجماعته (2000) . إن النسب الكبيرة لهذه البكتريا تؤدي إلى تكون سريع للويحة السنية وتلف أسرع لأسنان الأطفال وتؤدي بقايا الغذاء الغنية بالسكريات القابلة للتخمر في أسنان الأطفال إلى زيادة نسب هذه البكتريا(Marsh, 2006 and Tanner *etal*,2002) وأشار كل من Nogueiraوجماعته (2005) و,Tinanoff وجماعته(2002) إلى إن النسبة الأكبر لبكتريا *S.mutans* قد تنتقل للأطفال من الأم أو الأشخاص المقربين.تعود أمراضية اللويحة السنية إلى وجود بكتريا *S.aureus* التي سجلت نسبة 18.3% في عينات الأطفال وهي بكتريا ممرضة وكذلك إلى وجود بكتريا *E.coli* (8.3%) كما هو موضح في شكل 2 (John and Lindsay,2006). في حين كانت عدد أنواع البكتريا المعزولة من البالغين أكثر من الأطفال وسادة بكتريا *Streptococcus* (34.5 %) (*S.mutans* 17.2%,*S.sanguis* 5.2% *S.salivarius* 11.8% ,*S.mutans* 25%,*S.sanguis* 8.3%)

Thomas في جاء ما مع يتوافق وهذا (25.8%) *Lactobacillus* بكتريا تلتها (*S.mitior* 12.1%, etal,2008. سجلت بكتريا *S.aureus* نسبة 19% وبكتريا *S.epidermidis* نسبة 5.2% إذ أشار Hua وجماعته (2000) إلى إن وجود هذه البكتريا مع *S.mutans* التي تنتج كمية كبيرة من الحامض يسبب تلف وتنخر للأسنان والتهاب حول السن (Paesleme *etal*,2006) كما تواجدت البكتريا السالبة لصبغة كرام بنسبة 10.3% لـ*E.coli* و5.2% لـ *E.aerogenes* (Wirthlin *etal*,2003) (شكل 3).



شكل 2:النسبة المؤية للعزلات البكتيرية المعزولة من عينات plaque للأطفال



شكل 3: النسبة المؤية للعزلات البكتيرية المعزولة من عينات plaque للبالغين

***التعداد البكتيري الكلي الحي (viable TBC) للعينات المدروسة**

تراوح viable TBC بين 0.17−3 * 10^9(بمعدل 1.63 *10^9) cfu\ml\plaque للعينات المأخوذة من الأطفال و 0.16−3* 10^8 (بمعدل 1.94* 10^8) cfu\ml\plaque للعينات المأخوذة من البالغين (جدول 2−). أظهرت هذه الدراسة إن TBC لعينات الأطفال أكثر من البالغين ويعود ذلك إلى قلة تناول المواد السكرية والاعتناء بالأسنان لدى البالغين (Brown *etal*,2000) تتزايد إعداد البكتريا200 مرة في الأسنان عند تناول الأغذية النشوية والسكرية ويساعد بذلك إهمال الأسنان مما يؤدي إلى تسوسها ويعد هذا المرض الأكثر شيوعا في عمر الطفولة (Harris *etal*,2004;Ribeiro *etal*, 2005) وذلك لكون مينا الأسنان والية الدفاع في الأطفال في حالة تكون مما يزيد من فرصة بناء plaque ذكر Davis وجماعته (1990) و John and Lindsay (2006) إن معدل TBC في اللويحة السنية هو 10^{11}cfu\ml\plaque وهذا قريب من المعدل المتحصل عليه من هذه الدراسة في حين أشارت مصادر أخرى إلى إن معدل TBC يصل الى 1.4* 10^8و8.4*10^{10} cfu\ml\plaque (Thomas *etal*, 2008; Washio *etal*, 2005) وهي نتائج قريبة جدا من نتائج الدراسة .

جدول 2 :الاعداد البكتيرية الحية (viable TBC) المعزولة من عينات plaque المدروسة

رقم العينة	العدد البكتيرى الكلى (viable TBC)	
	الأطفال (10^9)cfu\ml\plaque	البالغين (10^8) cfu\ml\plaque
1	1.5	2
2	2	2.9
3	3	1.2
4	0.9	2.6
5	0.85	3
6	2.4	2.5
7	1.6	2.1
8	1	1.5
9	1.3	3
10	2.9	2.9
11	0.8	1.9
12	2.3	2.8
13	1.9	2
14	0.7	3
15	1	0.18
16	2.2	2.3
17	2.4	0.25
18	1.1	1.4
19	0.17	2.1
20	2.9	0.16
21	1	2.2
22	1.3	2.9
23	2.5	0.9
24	1.9	1.2
25	1.1	1.4
المعدل	1.63	1.94

CFu : colonyforming unit
TBC : Total Bacterial count

References

Aebi, H. 1974. Methods of enzymatic analysis. Academic Press. New York.2: 674-84.

Anne, A. 2006. Early childhood caries: new knowledge has implications for breast feeding families. Leaven. 42(2): 27-31.

Brown, L.J. ; Wall, T.P. and Lazar, V. 2000. Trends in untreated caries in primary teeth of children 2 to 10 years old. J. Am. Dent. Assoc.131: 93-100.

Camilli, A. and Bassler B.L.2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. Science. 311 (5764): 1113-1116.

Davis, B.D.; Dulbecco, R. ; Eisen, H.N. and Ginsberg, S.H. 1990. Microbiology. 29th ed. Lippincott com. Philadelphia. USA.

Desoet,J;Nyvad,B;Kilin,M.2000. Strain related acid production by oral Streptococci.Caries Res.34:486-490.

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbial. Rev.15(2): 167-193.

Harris, R.; Nicoll, A.D.; Adair, P.M. and Pine, C.M. 2004. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. Community Dent. Health.21:71-85.

Hua, X.; Cook, G.; Costerton, J.; Bruce, G. and Lamont,T. 2000. Intergeneric communication in dental plaque biofilms.J. Bacteriol. 182(24): 7067-7069.

John, G.T. and Lindsay, A.N. 2006. Managing the complexity of adynamic biofilm. J. Am.Dent. Assoc . 137(3): 10-15 .

Kidd, E.A. and Fejershor, O. 2004. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J. Dent. Res. 83 :35-38.

Kolenbrander,P.:Andersen,R.;Kasmerak,K.2000.Coaggregation and coadhesion in oral biofilm .Society for General microbiology symposium.59:65-85.

Leonard, M.R. 2002. EM Evalution of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. JOE. 28: 12.

Li, Y.; Ge, Y.; Saxena, D. and Caufield, P.W. 2007. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early childhood caries. J. Clin. Microbiol. 45(1): 81-87.

Loesche, W.J. 1976. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci. Rev. 9: 65-107.

Loeshe,W.1986.Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay microbial Rev.50:353-380.

Macfaddin, D.F.2002. Biochemical tests for identification of medical bacteria . 3rd ed. Lippincott Williams and Willeins. Philadelphia , USA.

Marsh, P.D. 2006. Dental plaque as a biofilm and microbial community. implications for health and disease. BMC Oral Health. 6(1): 14.

Noguchi, N.; Noiri, Y.; Narimatsu, M. and Ebisu, S. 2005. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontio pathogens . 71(12) : 8738-8743.

Nogueira, R.D.; Alve, A.C.; Napimoga, M.H. and Mattos-Graner, R.O. 2005. Characterization of salivary immunoglobulin A response to heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans* specific antigen recognition in infection. Infect. Immun. 73(1): 5675- 5684.

Paesleme, A.F.; Koo, H. ; Bellato, C.M. Bedi, G. and Cury, J.A. 2006. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-New insight. Dent. Res. 878-887.

Pratten , J.; Wills, K.; Barnett, P. and Wilson, M. 1998. In vivo studies of the effect of antiseptic-containing mouth washes on the formation and viability of *streptococcus* biofilms. Appl. Microbiol. 84: 1149-1155.

Ribero,C;Tabohoury,C;Delbel, A2005.Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. Br J Nutr.94:44-50.

Quigley ,G.A. and Hein, J.W. 1962 Comparative cleaning effecialy of manual and power brushing. J. Am. Dent. Assoc. 65: 26-29.

Tanner,A;Milgrom,P;Kent,R.2002.Similarity of the oral microbiotaof pre-school children with that of their caregivers in apopulation based study .Oral microbiolimmunol.17:379-387.

Ted, R.J.and Christine, L.C. 1995. Laboratory experiment in microbiology. 4th ed. Benjami /Cummings. California , USA.

Tinanoff, N.; Kanellis,M.and Vargas,C. 2002. Current understanding of the epidermiology, mechanisms and prevention of dental caries in preschool children. Pediatr. Dent. 24: 543- 551.

Thomas, R.Z .;Vandermei, H.C.; Vanderveen, M.H.; Desoet, J.J. and Huysmans, M.C. 2008. Bacterial composition and red flourescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. Oral Microbiol. Immun. 23: 7-13.

Washio, J., Sato, T.; Koseki , T. and Takahashi, N. 2005. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. J. Med. Microbiol.54 : 889-895.

Welin, J; Wilkin,J;Beighton,D.2003.Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMSmicrobiol let.227:289-293.

Wirthlin , M.R.; Marshall, G.W. and Rowland, R.W. 2003. Formation and decontamination of biofilms in dental unit water lines. J. Periodentol. 74: 1595-1609.