

* التعبير الجيني النسبي لمورثات بعض عوامل الضراوة وتكوين الأغشية الحيوية لبكتريا *Streptococcus mutans* باستخدام تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي (RT-PCR)

وفاء عبد الواحد جليل الكعبي
قسم علوم الحياة – كلية التربية
جامعة القادسية
alkaaby@yahoo.com

عدنان حمد الحمداني
فرع الأحياء المجهرية – كلية الطب
جامعة القادسية

ماجد كاظم عبود الشبلي
قسم علوم الحياة – كلية التربية
جامعة القادسية

الخلاصة:

تم عزل 479 عزلة جرثومية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المراجعين من كلاً الجنسين وبأعمار مختلفة للمراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية بعد أن شُخصوا سريريًا بالتهابات الفم (الأسنان واللثة) من قِبل الأطباء المختصين للمدة من 2012/11/1م ولغاية 2013/3/1م. شُخصت العزلات الجرثومية باستخدام جهاز الفايترك إلى موجبة وسالبة لصيغة جرام تصدتها بكتريا المكورات السحبية *Streptococcus spp.* بأعلى نسبة بلغت 31.52% تلتها بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* بنسبة 20.45% وبكتريا غصيات الحليب *Lactobacillus spp.* بنسبة 12.52% ثم خميرة *Candida spp.* بنسبة 10.64%، وتوالت بعدها بعض البكتريا التي أحرزت نسباً قليلة مقارنةً بالبكتريا المذكورة، كما أحرزت بكتريا المكورات السحبية الغشائية *S. mutans* من بين الأنواع الجرثومية المعزولة من سطوح الأسنان واللثة أعلى تردداً في عدد العزلات (56 عزلة). وباستعمال تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي [Quantitative (qRT-PCR) real time-polymerase chain reaction] المعتمدة على العد النسبي الذي يُمَثَّل التعبير الجيني لمورثات الضراوة والغشاء الحيوي لبكتريا *S. mutans*، وأثبت الاختبار ما يلي:

- انخفاض معنوي في العد النسبي لمستويات التعبير الجيني لمورثات عوامل الضراوة (*gbpB* و *spaP*)، ما عدا مورثة *gtfB* التي أظهرت إختلافات معنوية بين معاملاتها عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.
- انخفاض معنوي في العد النسبي لمستويات التعبير الجيني لمورثات الغشاء الحيوي (*brpA* و *luxS*) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

كلمات مفتاحية: التعبير الجيني النسبي، الأغشية الحيوية، المكورات السحبية، تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي

المقدمة Introduction

تمتلك بكتريا *Streptococcus mutans* عوامل ضراوة تميزها عن بقية عزلات Streptococci الفموية المعزولة من التجويف الفمي، كما أنها مُتحملة للحموضة Acidity نسبياً ومُنْتِجة لبعض الإنزيمات التي لها دوراً في عملية الالتصاق وإستعمار سطوح الأسنان⁽¹⁾.
تمتاز بكتريا *S. mutans* بقدرتها على تصنيع الكلوكاكون Glucagon غير الذائب من السكرز وكذلك تنتج حامض اللاكتيك من الكلو كوز، بالإضافة إلى هذه الميزات فهي تمتلك بعض المورثات التي تُعد من عوامل الضراوة^(1 و 2) المُتضمنة:

- مورثات *gtfB* و *gtfC* و *gtfD* التي تُشَفَّر إلى إنزيم Glucosyl transferase.
- مورثتي *gbpC* و *gbpA* التي تُشَفَّر إلى البروتينات المرتبطة بالكلوكان Glucan binding proteins.
- مورثة *brpA* التي تُشَفَّر إلى البروتينات المُنظِّمة للأغشية الحيوية Biofilm regulatory proteins.
- مورثة *spaP* التي تُشَفَّر إلى بروتينات الالتصاق بسطوح الخلايا Cell surface adhesion proteins.
- مورثة *luxS* التي تُشَفَّر إلى تكوين الغشاء الحيوي Luxes system.
- مورثة *Ldh* التي تُشَفَّر إلى إنزيمات Lactic dehydrogenase.

إنَّ الإنزيمات المُنتجة من *S. mutans* تُصنَّع Extracellular poly saccharides (EPS) و Intercellular poly saccharides (IPS) من الكربوهيدرات⁽¹⁾ والتي توفر الحماية لتلك الجرثومة وبقية جراثيم الفم ضد المضادات الحيوية مُضعفةً بذلك من مناعة جسم المضيف⁽³⁾.

* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

كما تحوي الأنواع البكتيرية على مواقع إلتصاق مع خلايا الجراثيم الأخرى من خلال روابط تعمل كمواقع إستقبال من خلال إنزيم Glycosyl transferase، وعندما يحصل الإلتصاق البكتيري على سطح الأسنان تطلق هذا الإنزيم بآلية بتكوين الغشاء الحيوي من تجمع المستعمرات البكتيرية (4).

يُمثل الغشاء الحيوي Biofilm مجتمعاً بكتيرياً إرتبطت خلاياه بسطح نصف مغمور، وغُلقت بصورة أساسية بقالب من مواد بوليميرية خارج خلوية Exopolymers (EPS) منتجةً من تلك الخلايا التي تظهر طرازاً مظهرياً مغايراً للخلايا عندما تكون حرة من ناحية نسبة النمو والتعبير الجيني (5).

كما أنَّ عملية التماثل بين الخلايا البكتيرية تتكون من ثلاثة أركان رئيسية هي الإشارات المكونة من مركبات كيميائية تدعى بالمستحثات الذاتية Auto induced التي تُفرز عند حصول تغيرات في كثافة المجتمع البكتيري أما إلى البيئة الخارجية أو تبقى مرتبطةً بالخلية وهنا الإشارة هي Lux-S أو يُطلق عليها Ai-2 التي هي نظام التعرف على الإشارات التي تُطلق من قبل تجمعات البكتيريا عند تكوين الغشاء الحيوي والمورثات المشفرة لإنتاج الإشارات وأنظمة التعرف، ويُطلق على هذه العملية برمتها بتحسس النصاب Quorum sensing (6). كما أنَّ مورثة LuxS تُشفر من قبل بكتريا *S. mutans* في نهاية الطور اللوغارثمي Log phase لمنحنى النمو في البكتريا وتؤدي دوراً رئيسياً في تكوين الغشاء الحيوي، ويتحكم تحسس النصاب بعدد كبير من الفعاليات الحيوية البكتيرية منها العلاقات التعايشية مع الكائنات متعددة الخلايا بضمنها عوامل الضراوة وحركة البكتريا والبدء في الطور التمهيدي للنمو Lag phase وتكوين المجتمعات البكتيرية المكوّنة للغشاء الحيوي (6 و 7).

يختلف نظام التماثل في البكتريا السالبة لصبغة كرام عن الموجبة منها ففي الأولى تتكون المحفزات الذاتية Acylate homoserine lactone التي تُشفر من مورثة LuxI ويتم التعرف عليها من قبل بروتين منشط إستنفاي مُشفر من مورثة LuxR (8).

أما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام فتُمثل جزيئات الإشارة الببتيدية Peptide signaling molecules المحفزات الذاتية عبر بروتين ناقل يُدعى Atp-Binding Cassette (A-BC) ويتم التعرف عليه بواسطة بروتينين متحسين يُنتجان من أصل واحد (9)، وهناك مورثة أخرى مُنظمة لعملية تحسس النصاب هي Biofilm regulatory (*brpA*) protein ولها دوراً كبيراً في عملية تنظيم ألبكتريا في العزلة القياسية (Ua15 A) لجرثومة *S. mutans*، كما أنَّ مورثة *brpA* تُشفر لتكوين 406 حامضاً أمينياً وهي مسؤولة أيضاً عن تصنيع المُستحث التلقائي (Ai-2) ويعني أنَّ المورثات تعمل معاً على إستقرار الأغشية الحيوية وتنظيم التعبير الجيني لجرثومة *S. mutans* لتكوين هذه الأغشية التي من صفاتها مقاومة المضادات الحيوية.

إنَّ دراسة الوراثة الجزيئية Molecular genetics لبعض خصائص عوامل الضراوة لبكتريا *S. mutans* المرضية يمكن أن يقود ليس فقط إلى معرفة أو فهم الدور لتلك العوامل في نشوء التسوس وإنما يمكن أن يؤدي إلى الإقتراب من التقليل المتزايد لتأثير تلك العوامل على التسوس (1) وأنَّ التداخل ما بين الأنواع البكتيرية يلعب دوراً في ديناميكية المجتمعات البكتيرية؛ إذ إنَّ بعضها يُعزز تكوين الإسوداد وتطور أمراض أخرى منها تسوس الأسنان وإلتهاب ما حول السن لذلك فمن الأفضل فهم التداخل بين الخلايا البكتيرية المرضية الفموية والتعايشية وتأثير ذلك التداخل على التعبير الجيني لبعض عوامل الضراوة والإمراضية، ويُعتقد أن وجود أنواعاً من النبيت البكتيري يمكن أن تؤدي إلى الإختلاف في التأثير على تكوين الغشاء الحيوي والتعبير الجيني لعوامل الضراوة لبكتريا *S. mutans* (10 و 11).

هدف الدراسة Aim of study

إختبار قدرة *S. mutans* على تكوين الغشاء الحيوي مختبرياً وتوكيد تشخيص *S. mutans* جزيئياً بإستخدام مورثة 16s rRNA.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

أولاً: جمع العينات Collection of samples

جُمعت 479 عذلة بكتيرية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المصابين بالتهاب اللثة والأسنان الذين راجعوا المراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة لمدة أربعة أشهر إمتدت من (2012/11/1 م) حتى (2013/3/1 م)؛ إذ أخذت المسحات بإشراف الطبيب المختص وإستخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل (Transport media swabs) في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات.

ثانياً: العزل والتشخيص البكتيري Bacterial isolation and identification

أ- العزل Isolation

زُرعت عينات المسحات القطنية Swabs المأخوذة من منطقة تسوس الأسنان بعد أن تم حضنها بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة لغرض تنشيط البكتريا بطريقة التخيط على الأوساط الزرعية الإغناذية كوسط آغار الدم والماكونكي بتريقتي الزرع الهوائي واللاهوائي، وحُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعد إكمال عملية الحضان أجريت الفحوصات المظهرية والكيموحيوية.

ب- التشخيص بنظام الفايترك Vitek compact2 system diagnosis يُعد نظام الفايترك من الأنظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في التشخيص البكتيري، إذ يعطي نتائج دقيقة تصل دقتها إلى 99%. ولغرض التأكد من العزلات البكتيرية إستُخدم النظام أعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة له وفقاً لـ (12).

ثالثاً: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates

1- الحفظ قصير الأمد Short term storage: أديمت العزلات البكتيرية لأسابيع قليلة على وسط آغار الماكونكي. صُبَّ الوسط الزرع على بشكل مائل (Slant) ولقحت الأطباق ثم لُفت جيداً بشريط بارافيلم (Parafilm) وحُفظت بدرجة حرارة 4°م (13).

2- الحفظ طويل الأمد Long term storage: إستُخدم وسط نقيع الدماغ والقلب بإضافة الكليسرين بتركيز 20% ووزع الوسط في قناني صغيرة محكمة الغلق وبحجم 10 مل لكل قنينة ثم عُقت بالموصدة ولُفتت بعدها بنسبة 0.01 مل من مزارع جرثومة *Sterptococcus spp.* ثم حُصنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وحُفظت بعدها بدرجة -20°م (14). إستُخدمت هذه الطريقة لحفظ المزارع الجرثومية لمدة طويلة تصل إلى ثلاثة أشهر.

رابعاً: فحص (qRT-PCR) Quantitative Real Time-PCR

أجري فحص ألد qRT-PCR لعينات ألد cDNA لتحديد مستوى العد النسبي Relative quantification لمورثات عوامل الضراوة Virulence genes والمورثات المكونة للأغشية الحيوية Biofilm formation genes وكذلك للمورث المحافظ القياسي 16s rRNA gene؛ حيث إستُخدمت عُدّة Accupower Green Star Real-Time PCR kit المجهزة من شركة Bioneer الكورية لإجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء والتي تتفاعل مع المورثات المتضخمة في جهاز ألد Real-Time PCR وأجري الفحص بحسب طريقة (15)، وكالاتي:

1- تحضير المنحنى القياسي Standard curve للعد النسبي Absolute quantification: حُضِرَ المنحنى القياسي للحمض النووي DNA لبكتريا *S. mutans* بأخذ عينة واحدة من الحامض النووي المستخلص DNA وقياس تركيزها بجهاز Nanodrop spectrophotometer وبعد ذلك إستُخدم برنامج DNA copy number calculation وموقع NCBI whole genome sequence لحساب عدد نسخ الحامض النووي في العينة (DNA copy number) إذ كانت العينة تحتوي على ما يقارب 1×10^8 copy number ومن هذا التركيز عملت سلسلة من التخفيف العشرية (1×10^1 و 1×10^2 و 1×10^3 و 1×10^4 و 1×10^5 و 1×10^6 و 1×10^7 و 1×10^8) ثم أُختبرت أربعة تراكيز فقط لتحضير مزيج تفاعل المنحنى القياسي (جدول-1) وأضيفت هذه المكونات المذكورة في الجدول إلى أنابيب عُدّة Accupower Green star qPCR premix الحاوية على مزيج تفاعل صبغة السايبر الخضراء لفحص Quantitative Real-Time PCR.

جدول (1): مكونات مزيج تفاعل المنحنى القياسي للعد النسبي.

مكونات qRT-PCR master mix	الحجم (مايكرو لتر)	
Genomic DNA dilution template (1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8)	5	
Primers (16s rRNA) (10 pmol)	Forward primer	1
	Reverse primer	1
DEPC water	13	
Total	20	

2- تحضير مزيج تفاعل qPCR للعد النسبي Relative quantification: إستُخدم العد النسبي لحساب مقدار التغير في مستويات التعبير الجيني لكل من مورثات الهدف (مورثات المقاومة وتكوين الأغشية الحيوية) والمورث المحافظ القياسي بإستخدام العُدّة نفسها لمزيج تفاعل المنحنى القياسي (Accupower green star qRT-PCR premix)، وكالاتي:

أ- تحضير مزيج تفاعل qRT-PCR جينات الهدف Target genes (جدول-2).

جدول (2): مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR جينات الهدف.

مكونات qRT-PCR master mix	الحجم (مايكرو لتر)	
cDNA template for treatment or control samples	5	
Primers (16s rRNA) (10 pmol)	Forward primer	1
	Reverse primer	1
DEPC water	13	
Total	20	

ب- تحضير مزيج تفاعل qRT-PCR المورث المحافظ القياسي HKG (جدول-3).

جدول (3): مكونات مزيج تفاعل qRT-PCR المورث المحافظ القياسي.

مكونات qRT-PCR master mix		الحجم (مايكرو لتر)
cDNA template for treatment or control samples		5
Primers (Target gene) (10 pmol)	Forward primer	1
	Reverse primer	1
DEPC water		13
Total		20

أضيفت مكونات الجدولين أعلاه إلى أنابيب عدة Accopwer Green star qPCR premix الحاوية على مزيج تفاعل صبغة السايبير الخضراء لفحص Quantitative Real-Time PCR ومن ثم وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي الممازج بسرعة 3000 دورة. دقيقة¹ لمدة ثلاثة دقائق وقبل وضع الصفيحة (qRT-PCR plate) صُممت أماكن وضع مزيج العينات لكل من عينات مجاميع المعاملة Treatments group وعينات مجاميع السيطرة كما في مخطط تصميم صفيحة ألـ qRT-PCR plate design الآتية:

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
spaP	A	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
gtF	B	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
gpB	C	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
prB	D	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
luX	E	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
ldh	F	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	C1	C2	C3
16s	G	T1	T1	T1	T2	T2	T2	C1	C2	C3	ST8	ST5	ST3
	H										ST8	ST5	ST3

شكل (1): مخطط تصميم صفيحة ألـ qRT-PCR.

T1: *S. mutans* in TSA broth + 1% glucose.

T2: *S. mutans* and *L. acidophilus* in MRSB broth + 1% glucose.

T3: *S. mutans* and *C. albicans* in BHI broth + 1% glucose.

وُضعت أنابيب مزيج تفاعل ألـ qRT-PCR لكل من المنحنى القياسي ومورثات الهدف والمورث المحافظ حسب التصميم الموجود في الشكل أعلاه وبثلاث مكررات لكل معاملة، بعدها نُقلت الصفيحة إلى جهاز (Exicycler 96 Real-Time PCR. Bioneer, Korea) وطُبقت الظروف الحرارية لـ qRT-PCR thermocycler conditions لكل المورثات حسب طريقة عمل العدة كما في جدول (4).

جدول (4): الظروف الحرارية المثلى لمراحل qRT-PCR لجميع المورثات المقاسة بحسب طريقة عمل العُدة.

qRT-PCR step	Temperature (°C)	Time	Repeat cycle
Initial denaturation	50	1 hour	Non
Denaturation	95	20 sec	Moderate
Annealing\Extention detection (scan)	60	30 sec	High
Melting	60 – 95	0.5 sec	

سادساً: طريقة تحليل بيانات Real-Time PCR
حُلَّت البيانات الناتجة من تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي باستخدام طريقة Livak التي وضعها (16) والمعتمدة على إستخراج الكمية النسبية Relative quantitative والكمية المطلقة Absolute quantitative من خلال عملية تصحيح ومعادلة مورثات الهدف مع مورثات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بيولوجي لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وكما في المعادلات التالية:

$$\Delta CT (\text{calibrator}) = CT (\text{ref, calibrator}) - CT (\text{target, calibrator})$$

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{CT (\text{reference}) - CT (\text{target})}$$

$$\Delta CT (\text{Test}) = CT (\text{ref, test}) - CT (\text{target, test})$$

$$\text{Ratio (reference/target)} = 2^{CT (\text{reference}) - CT (\text{target})}$$

سابعاً: التحليل الإحصائي Statistical analysis
حُلَّت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج التحليل الإحصائي (SPSS) نسخة 17 لجدول تحليل التباين (ANOVA) باتجاه واحد، وقورنت المتوسطات والخطأ القياسي (Std. error) والتباين المعنوي باستخدام إختبار أقل فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مستوى إحتمال $(P \geq 0.05)$.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

أولاً: عزل وتشخيص الجراثيم المتوطنة في الفم
جُمِعَت 409 مُسحة من الأشخاص المصابين بتسوس الأسنان وحُصِلَ منها على 479 عزلة شُخِّصت على أنها جراثيم موجبة وسالبة لصبغة كرام بجهاز الفايترك؛ إذ أظهرت النتائج الواردة في جدول (5) سيادة بكتريا المكورات السبحية *Streptococcus spp.* بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 31.52% (151 عزلة) من مجموع نسب الجراثيم المعزولة من مناطق تسوس الأسنان تلتها بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* بنسبة 20.45% (98 عزلة) ثم عُصيات الحليب *Lactobacillus spp.* بنسبة 12.52% (60 عزلة). كما سجَّلت خميرة *Candida spp.* نسبة عزل بلغت 10.64% (51 عزلة) وبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* نسبة 5.21% (25 عزلة) في حين إحتلت البكتريا (*Enterobacter spp.* و *Enterococcus spp.* و *Micrococcus faecalis* و *Corynebacterium spp.* و *Neisseria spp.* و *Shigella spp.* و *Escherichia coli* و *Proteus spp.* و *Klebsiella oxytoca*) النسب المئوية الأقل في تواجدتها في مناطق تسوس الأسنان بنسبة 4.17% (20 عزلة) و 3.34% (16 عزلة) و 2.92% (14 عزلة) و 2.50% (12 عزلة) و 2.08% (10 عزلة) و 1.67% (8 عزلات) و 1.25% (6 عزلات) و 0.83% (4 عزلات) و 0.83% (4 عزلات)، على التوالي.

كما يلاحظ من الجدول ذاته أن البكتريا العائدة لجنس المكورات السبحية *Streptococcus spp.* تُظهر تفوق بكتريا *S. mutans* على باقي أنواع المكورات السبحية المعزولة من مناطق تسوس الأسنان بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 37.09% (56 عزلة)، بينما جاءت بكتريا *S. sangius* في المرتبة الثانية بنسبة 12.58% (19 عزلة) تلتها كُلاً من بكتريا *S. mitis* و *S. intermedius* و *S. oralis* بنسبة 10.59% (16 عزلة) و 9.27% (14 عزلة) و 7.28% (14 عزلة)، على التوالي. كما ظهرت بكتريا *S. salivarius* بنسبة 6.62% (10 عزلات) و *S. pneumoniae* بنسبة 5.96% (9 عزلات)، أما أقل نسبة عزل فكانت من نصيب بكتريا *S. pyogenes* و *S. sorbinus* اللتان بلغت نسبة عزل كُلاً منهما 4.63% (7 عزلات) و 3.97% (6 عزلات)، على التوالي. ويوضِّح الجدول أيضاً أنَّ بكتريا *Staph. epidermidis* التابعة لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* أعطت أعلى نسبة مئوية بلغت 74.49% (73 عزلة) عند عزلها من مناطق تسوس الأسنان مقارنةً بجرثومة *Staph. aureus* البالغة نسبتها 25.51% (25 عزلة).

أما بكتريا *L. acidophilus* التابعة لجنس عُصيات الحليب *Lactobacillus spp.* فبلغت نسبتها المئوية 71.66% (43 عزلة) متفوقةً على بكتريا *L. casei* التابعة للجنس نفسه والبالغة نسبتها 28.33% (17 عزلة).

كما أظهرت الأنواع التابعة لخميرة المبيضات *Candida spp.* تفاوتاً في نسبة إصابتها، إذ تفوق النوع *C. albicans* بإحرازه أعلى نسبة مئوية بلغت 60.78% (31 عزلة) مقارنةً بكل الأنواع *C. tropicalis* بنسبة 23.52% (12 عزلة) و *C. glabrata* بنسبة 15.68% (8 عزلات) على التوالي. إن سيادة بكتريا المكورات السحبية على بقية الجراثيم المعزولة في الدراسة الحالية تتفق مع نتائج (17) كونها المسبب الرئيس لآفات التسوس (Caries lesions). كما أن سيادة النوع *S. mutans* على باقي الأنواع الأخرى يتفق مع ما وجدته (18) من سيادة بكتريا *S. mutans* على باقي الجراثيم المسببة لتسوس الأسنان. كما أن ظهور جراثيم المكورات العنقودية وخاصةً النوع *Staph. epidermidis* في محيط الفم يتفق مع ما وجدته (19) من أن سبب إنتشار البكتريا هذه في محيط الفم قد يعود إلى كونها من الممرضات المهمة ذات القدرة على إحداث الأمراض الإنتهازية (Opportunistic infections) بسبب تواجدها الطبيعي على أجسام الحاملين (Carrier) على الجلد وفي أعلى الأنف والقناة الهضمية والتناسلية (Landman, 2001). أو بسبب إمتلاكها للعديد من المستضدات السطحية والإنزيمات التي تساعدها في عملية إختراق أنسجة الجسم (20).

جدول (5): الجراثيم المعزولة من الفم ونسبها المئوية.

ت	الجراثيم المعزولة من الفم	عدد العزلات	%	أنواعها	عدد العزلات	%
1	<i>Streptococcus spp.</i>	151	31.52	<i>S. mutans</i>	56	37.09
				<i>S. sanguis</i>	19	12.58
				<i>S. mitis</i>	16	10.60
				<i>S. intermedius</i>	14	9.27
				<i>S. oralis</i>	14	9.27
				<i>S. salivarius</i>	10	6.62
				<i>S. pneumoniae</i>	9	5.96
				<i>S. pyogenes</i>	7	4.63
				<i>S. sorbinus</i>	6	3.97
2	<i>Staphylococcus spp.</i>	98	20.45	<i>Staph. epidermidis</i>	73	74.49
				<i>Staph. aureus</i>	25	25.51
3	<i>Lactobacillus spp.</i>	60	12.52	<i>L. acidophilus</i>	43	71.66
				<i>L. casei</i>	17	28.33
5	<i>Candida spp.</i>	51	10.64	<i>C. albicans</i>	31	60.78
				<i>C. tropicalis</i>	12	23.52
				<i>C. glabrata</i>	8	15.68
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	5.21	—	—	—
7	<i>Enterobacter spp.</i>	20	4.17	—	—	—
8	<i>Enterococcus spp.</i>	16	3.34	—	—	—
9	<i>Micrococcus feacalis</i>	14	2.92	—	—	—
10	<i>Corynebacterium spp.</i>	12	2.50	—	—	—
11	<i>Neisseria spp.</i>	10	2.08	—	—	—
12	<i>Shigella spp.</i>	8	1.67	—	—	—
13	<i>Escherichia coli</i>	6	1.25	—	—	—
14	<i>Proteus spp.</i>	4	0.83	—	—	—
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0.83	—	—	—
	العدد الكلي للعزلات	479	100			

وفيما يخص عصيات الحليب المحبة للحموضة *L. acidophilus* فإن نتائج عزلها جاءت متوافقة مع نتائج (21) في نسبة العزل. وأن سيادة خميرة المبيضات في الفم على باقي أنواع الخمائر الأخرى تتفق مع (19) إذ أن الإصابات الفطرية في المرضى الضعاف مناعياً تتضمن خميرة المبيضات دائماً؛ ذلك لإمكانيتها من إظهار قابليتها للإمراضية كمرضات حقيقية في بعض الظروف كإنتاجها لإنزيمات Proteinase و Uronidase و Collaginase و Neuroaminidase التي تساعدها في إختراق إنسجة وخلايا المضيف وإحداث الإمراضية (22). كما أن إختلاف نسب العزل للأنواع التابعة للعائلة المعوية (السالبة لصبغة جرام) يعود إلى ندرة وجودها في محيط الفم، وهذا ما أكدته دراسات كل من (18 و 19 و 23) من أن معظم البكتريا السالبة لصبغة جرام تأتي من التهابات الجهاز التنفسي أو من القناة المعوية - المعوية وتظهر في الفم. وأوضح (24) أن الإختلاف في نسب العزل يتغير تبعاً لتغير الإصابة، ووجد (25) أن نسب عزل البكتريا تزداد بإزدياد أعداد

الأسنان المسوّسة. كما يُعتقد أن لنوعية الوسط الزراعي المستعمل وطريقة العزل وعوامل أخرى غير معروفة تأثيراً كبيراً في إختلاف نسب العزل للجراثيم، إضافة إلى أن الإختلاف في مستوى الوعي الصحي والعناية المستمرة بتنظيف الأسنان وثقافة المجتمع لها تأثيراً كبيراً على ذلك.

ثانياً: العد النسبي Relative quantification

لحساب التعبير الجيني Gene expression في كل من مورثات عوامل الضراوة (*gbpB* و *gtfB* و *spaP*) وتكوين الأغشية الحيوية (*luxS* و *brpA*) في بكتريا *S. mutans* تم إجراء العد النسبي باستخدام طريقة $2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak (Method) المعتمدة على عملية التصحيح (Normalization) باستخدام المورث المحافظ Housekeeping gene (*16s rRNA*)، وحُللت قيم الـ CT qRT-PCR لكل مورث من مورثات الهدف باستخدام قيم الـ CT للمورث المحافظ في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني.

أظهرت نتائج التعبير الجيني لكل المورثات المستخدمة في الدراسة وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في عزلات المعاملات ومجموعة السيطرة، حيث بيّنت نتائج التعبير الجيني لمورثة الضراوة *spaP* وجود إنخفاض واضح (تنظيم مخفّض Down regulation)؛ إذ كانت نتيجة المعاملة الأولى (T1) منخفضة بمقدار (0.608649±1234 fold change) بينما إنخفضت نتيجة المعاملة الثانية (T2) بمقدار (0.499098±1234 fold change) والمعاملة الثالثة (T3) بمقدار (0.499098±1234 fold change) مقارنةً مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة ⁽¹⁶⁾ بمقدار (1fold change) (جدول-6).

جدول (6): التعبير الجيني لمورثة *spaP* باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak Method).

Mean ± Std. Error	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	$\Delta\Delta CT$	ΔCT (contr)	ΔCT (Test)	CT <i>16s rRN</i>	CT <i>spaP</i>	Treatment isolate
0.255168±0.03625	0.285190929	1.81	-2.52	-0.71	37.12	36.41	T1
	0.183010712	2.45	-2.52	-0.07	37.32	37.25	T1
	0.297301779	1.75	-2.52	-0.77	37.04	36.27	T1
0.129276±0.00773	0.142595464	2.81	-2.52	0.29	37.16	37.45	T2
	0.129408115	2.95	-2.52	0.43	37.01	37.44	T2
	0.115823508	3.11	-2.52	0.59	37.29	37.88	T2
0.401437±0.10755	0.570381858	0.81	-2.52	-1.71	37.88	36.17	T3
	0.432268616	1.21	-2.52	-1.31	37.34	36.03	T3
	0.20166044	2.31	-2.52	-0.21	37.12	36.91	T3

C: Mono-species (*S. mutans*), T1: Dual-species (*S. mutans* with *L. acidophilus*)

T2: Dual-species (*S. mutans* with *C. albicans*) T3: Dual-species (*S. mutans* with *S. oralis*)

($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak and Schmittgenmethod) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *16s rRNA* gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

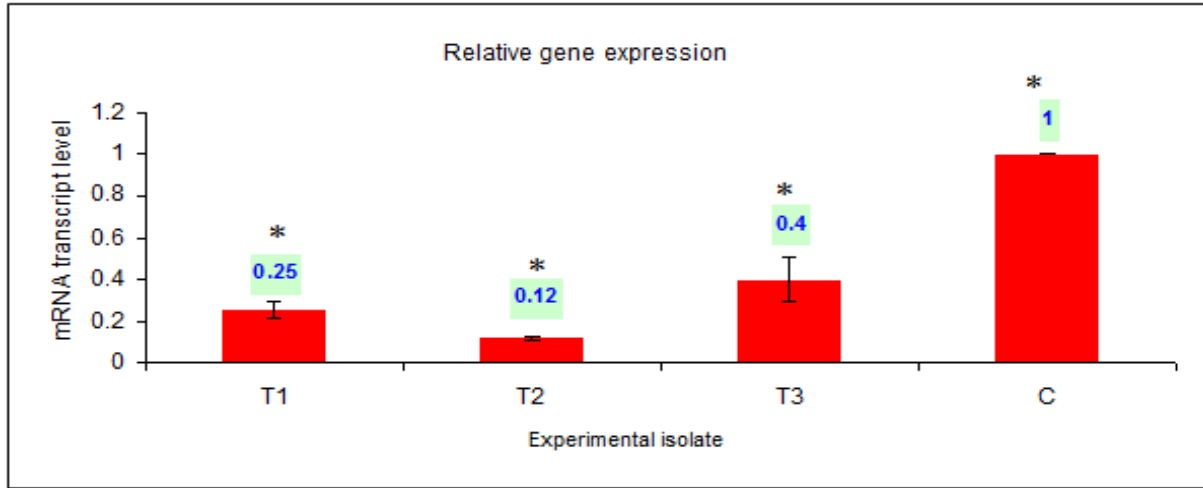
$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = ($2^{-\Delta\Delta CT}$): Normalized expression ratio

وأظهر الشكل البياني (2) للتعبير الجيني النسبي لمورثة *spaP* وجود فرق معنوي بين معاملات التجربة ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.



شكل (2): الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لمورثة *spaP* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

كما أظهرت نتائج التعبير الجيني لمورثة *gbpB* (جدول-7) وجود إنخفاض واضح (تنظيم مخفّض Down regulation)؛ حيث كانت نتيجة المعاملة الأولى (T1) منخفضة بمقدار (0.714839±1234 fold change) والمعاملة الثانية (T2) منخفضة بمقدار (0.902161±1234 fold change) بينما إنخفضت نتيجة المعاملة الثالثة (T3) بمقدار (0.571362±1234 fold change) مقارنةً مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة Livak و Schmittgen (2001) بمقدار (1 fold change).

جدول (7): التعبير الجيني لمورثة *gbpB* باستخدام طريقة (2^{-ΔΔCT} Livak Method).

Mean ± Std. Error	Fold change (2 ^{-ΔΔCT})	ΔΔCT	ΔCT (contr)	ΔCT (Test)	CT 16SrRNA	CT gbpB	Treatment isolate
0.726494±0.19190	0.37805464	1.403333	0.54666667	1.95	37.12	39.07	T1
	1.040059934	-0.05667	0.54666667	0.49	37.32	37.81	T1
	0.761368436	0.393333	0.54666667	0.94	37.04	37.98	T1
0.521031±0.09620	0.71038187	0.493333	0.54666667	1.04	37.16	38.2	T2
	0.396850263	1.333333	0.54666667	1.88	37.01	38.89	T2
	0.455861244	1.133333	0.54666667	1.68	37.29	38.97	T2
0.580678±0.08617	0.640231989	0.643333	0.54666667	1.19	37.88	39.07	T3
	0.410845157	1.283333	0.54666667	1.83	37.34	39.17	T3
	0.69095644	0.533333	0.54666667	1.08	37.12	38.2	T3

C: Mono-species (*S. mutans*), T1: Dual-species (*S. mutans* with *L. acidophilus*)

T2: Dual-species (*S. mutans* with *C. albicans*) T3: Dual-species (*S. mutans* with *S. oralis*)

First, the CT of the target gene was normalized to that of the (2^{-ΔΔCT} Livak and Schmittgen method) as following: reference (ref) 16s rRNA gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

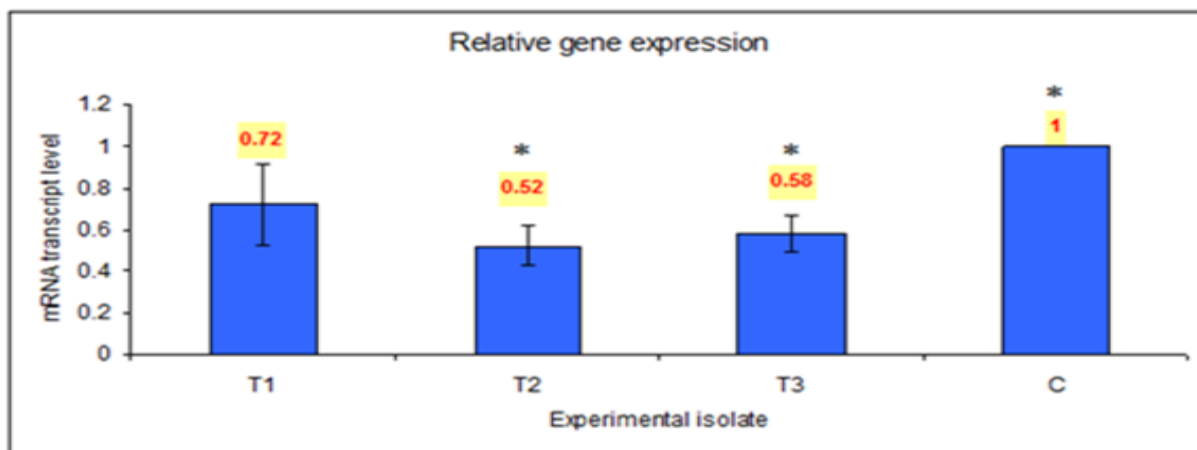
$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = (2^{-ΔΔCT}): Normalized expression ratio

كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لمورثة *gbpB* وجود فرق معنوي واضح بين المعاملات ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$ (شكل-3).



شكل (3): الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لمورثة *gbpB* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

* تشير إلى وجود فرق معنوي باختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

وبيّنت نتائج التعبير الجيني لمورثة *gtfB* (جدول-8) وجود إنخفاض نسبي (تنظيم مخفّض Down regulation) وارتفاع نسبي (تنظيم مرتفع Up regulation) ما بين المعاملات ومجموعة السيطرة؛ حيث كانت نتيجة المعاملة الأولى (T1) منخفضة بمقدار (0.741422±1234 fold change) والمعاملة الثانية (T2) منخفضة بمقدار (1.424309±1234 fold change) والمعاملة الثالثة (T3) مرتفعة بمقدار (0.893154±1234 fold change) مقارنةً مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة Livak و Schmittgen (2001) بمقدار (1 fold change).

جدول (8): التعبير الجيني لمورثة *gtfB* باستخدام طريقة (2^{-ΔΔCT} Livak Method).

Mean ± Std. Error	Fold change (2 ^{-ΔΔCT})	ΔΔCT	ΔCT (contr)	ΔCT (Test)	CT 16srRNA	CT <i>gtfB</i>	Treatment isolate
0.815091±0.13836	0.681443838	0.553333	0.20666667	0.76	37.12	37.88	T1
	0.6720622	0.573333	0.20666667	0.78	37.32	38.1	T1
	1.091768265	-0.12667	0.20666667	0.08	37.04	37.12	T1
0.425386±0.08669	0.577009376	0.793333	0.20666667	1	37.16	38.16	T2
	0.276752195	1.853333	0.20666667	2.06	37.01	39.07	T2
	0.422395587	1.243333	0.20666667	1.45	37.29	38.74	T2
2.318765±0.45806	2.324091174	-1.21667	0.20666667	-1.01	37.88	36.87	T3
	1.522736872	-0.60667	0.20666667	-0.4	37.34	36.94	T3
	3.109465621	-1.63667	0.20666667	-1.43	37.12	35.69	T3

C: Mono-species (*S. mutans*), T1: Dual-species (*S. mutans* with *L. acidophilus*)

T2: Dual-species (*S. mutans* with *C. albicans*) T3: Dual-species (*S. mutans* with *S. oralis*)

(2^{-ΔΔCT} Livak and Schmittgen method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) 16s rRNA gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

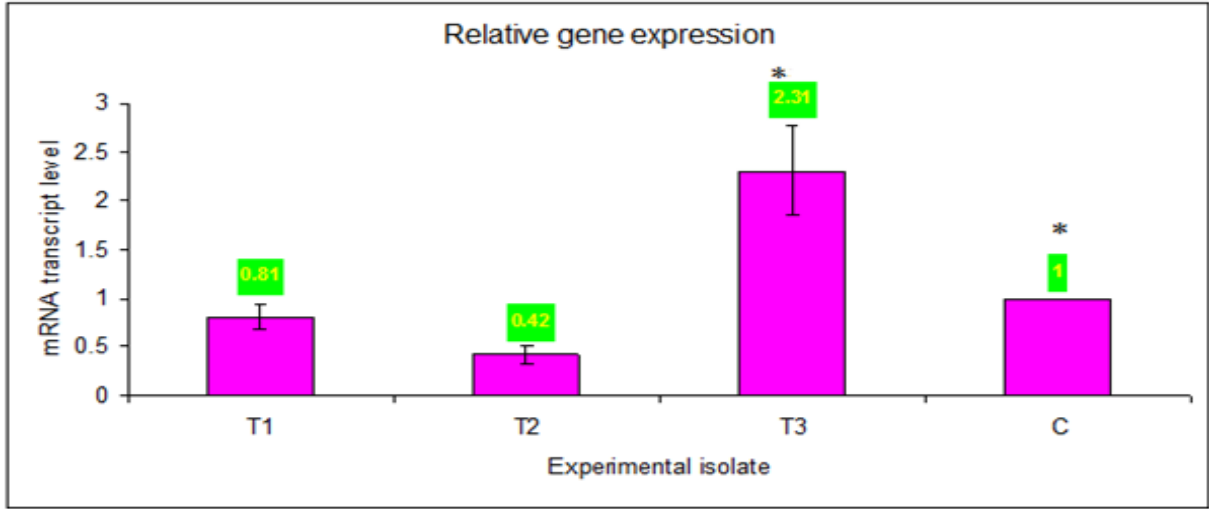
$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = (2^{-ΔΔCT}): Normalized expression ratio

وأظهرت بيانات التحليل الإحصائي لمورثة *gtfB* في شكل (4) وجود فرق معنوي واضح بين المعاملات ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.



شكل (4): الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لمورثة *gtfB* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

* تشير إلى وجود فرق معنوي باختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

كما أظهرت نتائج التعبير الجيني لمورثة *luxS* (جدول-9) وجود إنخفاض واضح (تنظيم مُخفَّض)، إذ كانت نتيجة المعاملة الأولى (T1) منخفضة بمقدار (0.382015±1234 fold change) والمعاملة الثانية (T2) منخفضة أيضاً بمقدار (0.902161±1234 fold change) بينما كانت نتيجة المعاملة الثالثة (T3) منخفضة بمقدار (0.037512±1234 fold change) مقارنةً مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة (16) بمقدار (1 fold change).

جدول (9): التعبير الجيني لمورثة *luxS* باستخدام طريقة (Livak Method) $(2^{-\Delta\Delta CT})$.

Mean ± Std. Error	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	$\Delta\Delta CT$	ΔCT (contr)	ΔCT (Test)	CT <i>16srRNA</i>	CT <i>gtfB</i>	Treatment isolate
0.47301±0.07360	0.561231024	0.833333	-0.8333333	0.00	37.12	37.12	T1
	0.326842312	1.613333	-0.8333333	0.78	37.32	38.10	T1
	0.530956902	0.913333	-0.8333333	0.08	37.04	37.12	T1
0.636296±0.25163	0.280615512	1.833333	-0.8333333	1.00	37.16	38.16	T2
	0.50580972	0.983333	-0.8333333	0.15	37.01	37.16	T2
	1.122462048	-0.16667	-0.8333333	-1.00	37.29	36.29	T2
0.038925±0.00779	0.052799448	4.243333	-0.8333333	3.41	37.88	41.29	T3
	0.038119332	4.713333	-0.8333333	3.88	37.34	41.22	T3
	0.025856426	5.273333	-0.8333333	4.44	37.12	41.56	T3

C: Mono-species (*S. mutans*), T1: Dual-species (*S. mutans* with *L. acidophilus*)

T2: Dual-species (*S. mutans* with *C. albicans*) T3: Dual-species (*S. mutans* with *S. oralis*)

($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak and Schmittgenmethod) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *16s* rRNA gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

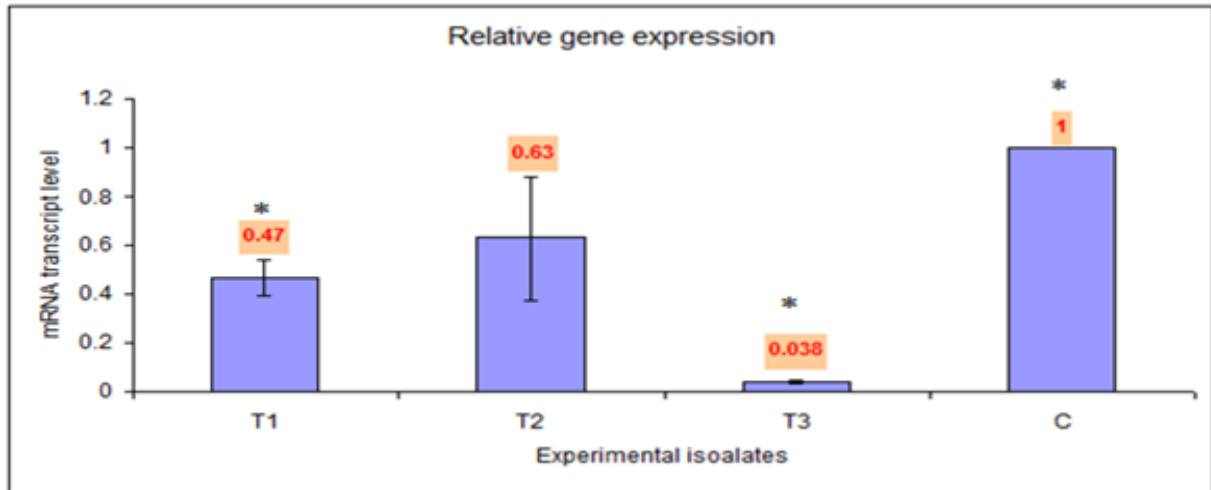
$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = ($2^{-\Delta\Delta CT}$): Normalized expression ratio

وبينّت نتائج التحليل الإحصائي لمورثة *luxS* وجود فرق معنوي واضح بين المعاملات ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$ (شكل-5).



شكل (5): الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لمورثة *luxS* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

* = تشير إلى وجود فرق معنوي باختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

أوضحت نتائج التعبير الجيني لمورثة *brpA* (جدول-10) وجود إنخفاض واضح (تنظيم مُخفَّض)، إذ كانت نتيجة المعاملة الأولى (T1) منخفضة بمقدار (0.32161±1234 fold change) والمعاملة الثانية (T2) بمقدار (0.231056±1234 fold change) بينما المعاملة الثالثة (T3) إنخفضت أيضاً بمقدار (0.199126±1234 fold change) مقارنةً مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبير جيني حسب طريقة (16) بمقدار (1 fold change).

جدول (10): التعبير الجيني لمورثة *brpA* باستخدام طريقة (2- $\Delta\Delta CT$ Livak Method).

Mean ± Std. Error	Fold change (2 ^{-$\Delta\Delta CT$})	$\Delta\Delta CT$	ΔCT (contr)	ΔCT (Test)	CT <i>16s</i> rRNA	CT <i>gtfB</i>	Treatment Isolate
0.20307±0.08459	0.102237757	3.29	-1.24	2.05	37.12	39.17	T1
	0.135841858	2.88	-1.24	1.64	37.32	38.96	T1
	0.371130893	1.43	-1.24	0.19	37.04	37.23	T1
0.125732±0.01464	0.112656308	3.15	-1.24	1.91	37.16	39.07	T2
	0.109575715	3.19	-1.24	1.95	37.01	38.96	T2
	0.154963462	2.69	-1.24	1.45	37.29	38.74	T2
0.204362±0.04553	0.285190929	1.81	-1.24	0.57	37.88	38.45	T3
	0.127626516	2.97	-1.24	1.73	37.34	39.07	T3
	0.200267469	2.32	-1.24	1.08	37.12	38.20	T3

C: Mono-species (*S. mutans*), T1: Dual-species (*S. mutans* with *L. acidophilus*)

T2: Dual-species (*S. mutans* with *C. albicans*) T3: Dual-species (*S. mutans* with *S. oralis*)

(2- $\Delta\Delta CT$ Livak and Schmittgenmethod) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) *16s* rRNA gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$

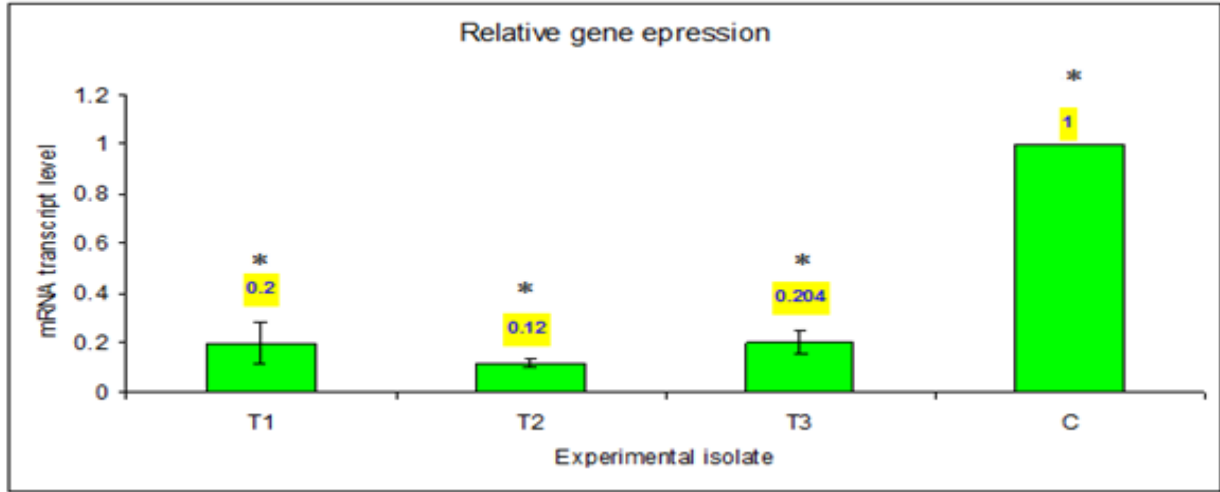
$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = (2^{- $\Delta\Delta CT$}): Normalized expression ratio

ولوحظ من نتائج التحليل الإحصائي لمورثة *brpA* وجود فرق معنوي واضح بين المعاملات ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$ (شكل-6).



شكل (6): الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لمورثة *brpA* في معاملات التجربة نسبةً إلى مجموعة السيطرة.

* = تشير إلى وجود فرق معنوي بإختبار LSD (أقل فرق معنوي) عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

إنّ تقنية تفاعل إنزيم سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (qRT – PCR) تمتاز بالدقة والحساسية وخاصةً عند قياس التعبير الجيني لإحدى الجراثيم؛ إذ تعطي هذه التقنية تفسيراً جزيئياً واضحاً من حيث النوع والكمية مقارنةً مع التقنيات الأخرى المستخدمة في المجال نفسه لتحديد إنتاج إنزيم RNase⁽²⁶⁾. وإنّ المفتاح الرئيس لفهم آلية حدوث النخر السني أو تسوس الأسنان تأتي من دراستنا لمورثات عوامل الضراوة التي تفرزها بكتريا *S. mutans* (*spaP* و *gbpB* و *gtfB*) بعد إستعمارها لسطوح الأسنان وتكوينها للغشاء الحيوي وتنظيم تكوين أغشية حيوية أخرى بتجمعات بكتيرية مختلفة⁽²⁷⁾ ومن خلال ما تفرزه من مورثات (*brpA* و *luxS*) تعد الأساس في عملية التآور ما بين الخلايا البكتيرية المتجمعة والتي تعمل على إستقرار الأغشية الحيوية وتنظيم التعبير الجيني لبكتريا *S. mutans*⁽²⁸⁾. وعندما تنمو جرثومة *S. mutans* بشكل منفرد في بيئة تحتوي على ظروف نمو متكاملة من مصدر كربوهيدراتي (سكر الكلوكوز) و pH مثالي لوسط النمو فإن مورثة *spaP* تكون مسؤولة عن عملية الإلتصاق (adhesion) التي تعد الخطوة الأولى لإستعمار هذه البكتريا لسطوح الأسنان وتكون موجودة ضمن تركيب المحفظة (Capsule) لتلك البكتريا⁽²⁷⁾. وبوجود السكرور أو الكلوكوز في الوسط تفرز *S. mutans* مورثة *gtfB* المسؤولة عن عملية تصنيع سكريات متعددة خارج خلوية (Extracellular poly saccharides) من خلال ما تنتجه من بوليميرات الكلوكان غير الذائب في الماء، وبمشاركة مورثة *gbpB* التي تُجهز مواقع لإرتباط السكريات المتعددة مع الكلوكان غير الذائب لتكوين حشوة (Matrix) أو أرضية لحماية البكتريا المتواجدة في التجويف الفموي⁽²⁸⁾. وعند نمو بكتريا *S. mutans* مع بكتريا *S. oralis* أو بكتريا *L. acidophilus* أو خميرة *C. albicans* يؤدي ذلك إلى التنافس على المواد الغذائية وعلى مواقع الإلتصاق على سطوح الأسنان مما يؤدي إلى تخفيض إنتاج مورثتي *gbpB* و *gtfB*، وهذا ما أظهرته نتائج الجدولين (6 و 7).

إنّ البكتريا المختلفة والمتجمعة في مواقع الإلتصاق والإرتباط تؤدي إلى تكوين أغشية حيوية يمكن تنظيمها بوساطة مورثتي *luxS* و *brpA*؛ إذ تكون الأولى مسؤولة عن تنظيم تكوين الغشاء الحيوي ومقاومته للظروف المحيطة به⁽⁹⁾ بينما الثانية تكون مسؤولة عن إستقرار الغشاء الحيوي وتنظيم التعبير الجيني لبكتريا *S. mutans*⁽²⁹⁾. ومن خلال نتائجنا الخاصة بهتئين المورثتين فإن مستويات العد المطلق والتعبير الجيني لهما أظهرتا إنخفاضاً معنوياً واضحاً بالنسبة لمجموعة السيطرة لكل من الجداول (8 و 9 و 10). ووجد أن سلالات *S. mutans* الفاقدة لمورثة *brpA* تتخفف قابليتها على زيادة معدلات الإتحلال الذاتي لطبقات الغشاء الخلوي ودورها في تنظيم نشوء الغشاء الخلوي أو السيطرة على عملية نشوءه وعدم إنحلاله إضافةً إلى دورها الرئيس في زيادة تحمل البكتريا للحوامض والأكسدة وكذلك تكوين الأغشية الحيوية⁽³⁰⁾.

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

أولاً: الإستنتاجات Conclusions

- 1- سيادة بكتريا *S. mutans* كمُسبب رئيس لأعراض الفم عند الإنسان وخاصةً تسوس الأسنان الذي له دوراً كبيراً في زيادة إنتشار الجراثيم في الفم وتكوينها للأغشية الحيوية وخاصة عند توفر الكربوهيدرات.
- 2- وجود فروق معنوية في العد الذسبي لمستويات التعبير الجيني لمورثات عوامل الضراوة والغشاء الحيوي عند مستوى احتمال $P \geq 0.05$.

ثانياً: التوصيات Recommendations

- 1- إجراء الفحص الدوري للفم للتحري عن وجود المسببات المرضية تجذباً لحدوث الإصابة اللعرقية، والتي يمكن لها إن تتطور إلى إصابة عرضية تؤثر على حالة الفم.
- 2- إجراء دراسات مكثفة على المستوى الوراثي للتعرف على الآلية التي من خلالها تُظهر العزلات الجرثومية تكوينها للأغشية الحيوية ومقاومتها للمضادات الحيوية.

المصادر References

- 1- Wen, Z. T.; Yates, D.; Ahn, S. – J. and Burne, R. A. (2010). Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. B.M.C. Microbiol., 10(111): 1 – 9.
- 2- Lehner, C.; Cole, M. F.; Bryan, M. K.; Evans, C. L.; Pearce, M. J.; Sheridan, P. A. and Sura, R. L. (1996). Humeral immunity to commensal oral in human infant salivary secretary Iga. Ab. reactive with *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis* and *S. fecalis* during first two year of life. Infect. Immun., 67: 1878 – 1886.
- 3- Shemesh, M.; Tam, A.; Aharoni, R. and Steinberg, D. (2010). Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. B.M.C. Microbiol., 10(51): 1 – 10.
- 4- Todar, K. (2008). Microbial World. (Microbe and Dental Disease). Univ. Wisconsin – Madison, PP: 375 – 390.
- 5- Donlan, R. M. (2002). Biofilm microbial life on surface. J. Emer. Infect. Disease, 8(9): 881 – 890.
- 6- Visick, K. L. and Fuqua, C. (2005). Decoding microbial chatter: cell – cell communication in bacteria. J. Bacteriol., 187(16): 5507 – 5519.
- 7- Lazazzera, B. A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. Cur. Opin. Microbiol., 3: 177 – 182.
- 8- Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kadal, N. and Lewis, K. (2004). Specialized per sister cells and the mechanism of multi drug tolerance in *E. coli* bacterial. 186: 8172 – 8180.
- 9- Wen, Z. T. and Burne, R. A. (2004). LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. J. Bacteriol., 186(9): 2682 – 2691.
- 10- Han, T. K. (2005). Development of a DNA vaccine against *Streptococcus mutans*: a novel approach to immunization against dental caries. Ph. D. Thesis, College of Arts and Sci., Univ. South Florida, USA.
- 11- Grenier, D. and Mayrand, D. (2000). Period Otitis as an Ecological Imbalance. in oral bacterial ecology: The Molecular Basis. Kurmaltsu, H. K. and Ellen, R. P. (eds). Horizon Scientific Press, Norfolk. U.K., PP: 275 – 310.
- 12- Fritsche, T. R.; Swoboda, S. E.; Olson, B. J.; Moore, F. M.; Meece, J. K. and Novicki, T. J. (2011). Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacterial Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. Marshfield labs. Lacrosse Univ. Wisconsin. USA.

- 13- Mainiatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 14- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance antimicrobial. Agents Chemother., 45: 999 – 1007.
- 15- Cheon, M.; Park, D.; Park, Y.; Kam, K.; Park, S. and Ryu, K. (2000). Homologous up regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA occurs through transcriptional activation rather than modulation of mRNA stability. Endocrine, 13: 47 – 53.
- 16- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantification PCR and the $2^{\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402 – 408.
- 17- Simon, L. (2007). The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. J. Microbiol., 2: 510 – 533.
- 18- الزبيدي، أسامة فيصل كوكز (2010). تأثير المعزز الحيوي (Probiotic) المُحضَّر من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* على إلتصاقية البكتريا المعزولة من تسوس الأسنان. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة القادسية. العراق.
- 19- الموسوي، علياء موسى علي (2006). عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض أمراض الفم في مدينة الناصرية وإختبار حساسيتها الدوائية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ذي قار. العراق.
- 20- Fong, I. W. (2002). Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. J. A. M. Dent. Assoc., 133: 75 – 135.
- 21- الحسيني، عدي متعب هادي (2002). دراسة مايكروبيولوجية لمسببات تسوس الأسنان وإلتهاب اللثة وما حول السن والخراجات حول الجذر في محافظة النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. العراق.
- 22- Rouabhia, M. and Chmielewski, W. (2012). Disease associated with oral poly microbial biofilms. The open Mycol. J., 6: 27 – 32.
- 23- Waltimo, T. M. T.; Siren, E. K.; Torkko, H. L. K.; Olsen, I. and Hapaselö, M. P. P. (1997). Fungi in therapy – resistant apical periodontitis. Int. Endod. J., 30: 96 – 101.
- 24- AL – Aswad, J. D. (1999). Prevalence and microbiology of oral mucosal lesion in a sample of complete denture wearers. M. SC. Thesis in Oral Medicine, College for Dentistry – University of Baghdad. Iraq.
- 25- Sulaiman, A. W. (2000). Quantitative measurement of urea content in saliva, acquired pellicle and dental caries susceptibility in human adults. M. SC. Thesis in Preventive Dentistry, College of Dentistry – University of Baghdad. Iraq.
- 26- Bustin, S. A. (2002). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay. J. Mol. Endocrinal, 25: 169 – 193.
- 27- Kuramitsu, H. K. (2001). Virulence properties oral bacteria impact of molecular biology. Curr. Mol. Biol., 3(2): 35 – 36.
- 28- Shemesh, M.; Tam, A. and Steinberg, D. (2007). Expression of biofilm – associated gene of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. J. Med. Microbiol., 56: 1528 – 1535.
- 29- Li, C. and Yu – Mei, W. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. Int. J. Oral Sci., 3: 66 – 73.
- 30- Bitoun, J. P.; Liao, S.; Yao, X.; Ahn, S-J.; Isoda, R.; Nguyen, A. H.; Brady, L. J.; Burne, R. A.; Abranches, J. and Wen, Z. T. (2006). The virulence of OMZ175, a highly invasive strain of *S. mutans*. J. Bacteriol., 188(8): 2983 – 2992.

***Relative gene expression for genes and virulence factors formation of biofilms of *Streptococcus mutans* bacteria using polymerase chain reaction in real-time (RT-PCR)**

Wafaa A. J. Al-Kaaby
Dept. Biology - College
of Education
AL-Qadisiya Univ.
alkaaby@yahoo.com

Adnan H. Al-Hamadani
Dept. Microbiology -
Medicine college
AL-Qadisiya Univ.

Majed K. A. Al-Shebli
Dept. Biology - College
of Education
AL-Qadisiya Univ.

Abstract:

A total of 479 bacterial isolates were collected from 409 swabs from the teeth surfaces, teeth and gingiva of the auditors admitted to the centers, specialist and dental clinics in Al-Diwaniya city for different ages by specialist doctor on period from 1/11/2012 AC till 1/3/2013 AC.

Bacterial isolates diagnosed by Vitek compact 2 system to positive and negative gram stain head it *Streptococcus* spp. by highest percentage of 31.52%, followed by *Staphylococcus* spp. by 20.45% and *Lactobacillus* spp. by 12.52% and *Candida* spp. by 10.64%, and follow then some germs that made a few percentages compared to the bacteria mentioned, also *S. mutans* obtain among microbial species isolated from teeth surfaces and gingiva frequency highest in the number of isolates (56 isolate) and tested their on biofilm formations; then 44 isolation (44.64%) high formations, 16 isolation (28.57%) medium formations and 15 isolation (26.79%) non biofilm formations. The impact of carbohydrates appear apparent on *S. mutans* isolates in biofilm formations on bio-growth medium; then amounted to the presence of sucrose 35.71%, followed by glucose with fructose together in the medium (25.00%) then glucose (16.07%) and fructose (12.50%). Quantitative real time – polymerase chain reaction (qRT-PCR) using based on two sides, the first: it is counting the absolute levels of mRNA in conservative gene (*16s* rRNA) to *S. mutans* and comparing it with the virulence factors genes (*spaP*, *gbpB* and *gtfB*) and biofilm genes (*luxS* and *brpA*) to those germ and the second: is the relative count which gene expression represents of virulence genes and biofilm *S. mutans*, and the test proved as follows:

- A significant decrease in relative count gene expression levels of genes virulence factors (*spaP* and *gbpB*), except gene *gtfB* which showed significant differences between the transactions at the probability level $P \geq 0.05$.
- A significant decrease in relative count gene expression levels of genes biofilm (*luxS* and *brpA*) at the probability level $P \geq 0.05$.

Key words: Relative gene expression, Biofilms, *Streptococcus mutans*, RT-PCR

*The Research is a part of Ph. D. Dissertation in the case of first researcher.