

FgBP FnBP PCR

دکتر زهره قلمکارپور*، دکتر فریبا قلمکارپور** دکتر هنگامه اشراف*، دکتر محمدعلی مزینی*، دکتر بهرام کاظمی***، دکتر امیر هوشنگ شکرانی****

Investigating the presence of FnBP & FgBP Coding genes with PCR method in microorganisms of infected root canal in patients referred to Shahid Beheshti Endodontic Department in 2000-2001

¹Ghalamkarpour Z. *DDS. MS.* ²Ghalamkarpour F. ¹Ashraf H. *DDS. MS.* ¹Mozayyeni MA. *DDS. MS.* ³Kazemi B. *MS.* ⁴Shokrani AH. *DDS.*

¹Assistant Prof. Dept of Endodontics, Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran-Iran.

²Doctor of Medicine, ³Associate Prof., Dept. of Immunology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran-Iran, ⁴Dentist.

Key Words: Infective Endocarditis, Bacteremia, Root canal therapy

Purpose: Infective Endocarditis (IE) is a microbial infection of the endocardial surfaces usually involving the cardiac valves. Most cases of IE are caused by streptococci which from a larg part of the normal oral flora. Staphylococci are the next most cause. These organisms are well equipped with surface determinants such as Fibronectin-Binding Protein and Fibrinogen-Binding Protein which mediate their adherence to the cardiac vegetations. In this study, the presence of these two cell-surface proteins have been detected by the polymerase chain reaction technique (PCR).

Method & Materials: This research is discriptive type and all the samples were selected from the adult patients referred to shahid Beheshti Dental School. Fifteen people were selected with no systemic disease or any antibiotic consumption during the last two weeks of sampling. Regarding the teeth studied, none of them had sinus tract, pulp exposure, periodontal disease or deeply broken restorations with wide open margins.

Results: Results show that, of 15 root canal samples, 11(73.3%) were positive for FnBP and 8(53.3%) were positive for FgBP. Regarding the endodontic treatment adjuncts like local anaesthetic administration, rubber dam placement or saliva control, we have also taken samples from gingival sulcus, caries and saliva in 11 patients of those 15 people. The relative frequency of FnBP in gingival sulcus, caries and saliva was 72.7%, 45.5% and 54.5% respectively and for the presence of FgBP in the same samples was 63.6%, 54.5% and 36.4% respectively.

Conclusion: IE prevention in suceptible patients is a duty, but it is better for dentists to use preventive cares in all impacted patients. *Beheshti Univ. Dent. J. 2005; 23(2):273-285*

خلاصه

سابقه و هدف: در حال حاضر این واقعیت نزد همگان پذیرفته شده است که اکثر بیماری های پالپ و پری اپیکال به سبب عفونتهای

*استادیار گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**پزشک

***دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
****دندانپزشک

میکروبی ایجاد می شوند. انجام تزریق بی حسی موضعی و یا نصب رابردم می تواند به باکتری منجر شده و در نتیجه فرد مستعد را در معرض خطر ابتلاء به اندوکاردیت عفونی قرار دهد. شایعترین ارگانیزم های مولد اندوکاردیت عفونی، آنهایی هستند که بیشترین توانایی را در اتصال به دریچه های معیوب و یا وژتاسیون های از پیش تشکیل شده دارا می باشند. فیبرینوژن باندینگ پروتئین (FgBP) و فیبرونکتین باندینگ پروتئین (FnBP) از مهمترین شاخص های سطحی بوده و به عنوان واسطه اتصال میکروارگانیزم ها (استرپتوکوک و استافیلوکوک) به وژتاسیون قلبی، ایفای نقش می کنند. هدف از انجام این تحقیق بررسی حضور دو ژن کد کننده چسبندگی (FgBP و FnBP) در میکروارگانیزم های کانال ریشه عفونی می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه توصیفی حضور این دو پروتئین سطحی توسط تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بررسی شده است. مزیت استفاده از این تکنیک نه تنها مرهون انجام راحت آن، بلکه از همه مهمتر به دقت و حساسیت بسیار قابل توجه آن بر می گردد. اگر در بررسی میکروارگانیزم های دهان مشخص شود که آنها واجد ژن FgBP و FnBP هستند، این احتمال وجود خواهد داشت که در فرد مستعد متعاقب ورود آنها به خون، اندوکاردیت عفونی ایجاد شود. بنابراین، در این تحقیق با محور قرار دادن درمان های اندودنتیک از کانال های عفونی ریشه دندانی ۱۵ نفر مراجعه کننده به دانشکده دندانپزشکی نمونه گیری شد.

یافته ها: پس از نمونه گیری و انجام آزمایش، نتایج حاکی از آن بود که در ۱۵ نمونه تهیه شده از کانال ریشه، حضور ژن FnBP در ۱۱ مورد (۷۳/۳ درصد) و حضور ژن FgBP در ۸ مورد (۵۳/۳ درصد) مثبت می باشد.

از آنجائیکه در حین درمان های اندودنتیک بعضی از اقدامات نظیر تزریق بی حسی، نصب رابردم یا کنترل بزاق بصورت جنبی به اجرا در می آیند، تصمیم گرفته شد تا در ۱۱ نفر از ۱۵ بیمار مورد مطالعه علاوه بر کانال ریشه از شیار لثه، پوسیدگی و بزاق نمونه گیری بعمل آید. در پایان فراوانی نسبی حضور ژن FnBP در شیار لثه، پوسیدگی و بزاق به ترتیب ۷۲/۷ درصد، ۴۵/۵ درصد و ۵۴/۵ درصد و در مورد ژن FgBP نیز به ترتیب ۶۳/۶ درصد، ۵۴/۵ درصد و ۳۶/۴ درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: پیشگیری از اندوکاردیت عفونی در افراد مستعد یک وظیفه محسوب می شود، ولی مهمتر این است که با توجه به پاتوژن بودن اکثر باکتریهای محیط دهان و کانال طبق نتایج آماری این تحقیق، دندانپزشک هنر پیشگیری از ابتلاء به اندوکاردیت عفونی در همه بیماران نهفته را داشته باشد و برای جلوگیری از ابتلاء بیماران مستعد به موارد ذیل تأکید می شود. ارتقاء و آموزش بهداشت، اجتناب از انجام چندین درمان تهاجمی و متعدد، استفاده از دهان شویه قبل از درمان، رعایت ایزولاسیون و استفاده از رابردم، حفظ دقیق طول کارکرد و جلوگیری از آزدگی لثه، و تجویز آنتی بیوتیک پروفیلاکتیک و اتخاذ سایر اقدامات پیشگیرانه لازم و ضروری می باشد.

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۲/۱۲/۶ تاریخ تأیید مقاله: ۸۳/۲/۸

واژه های کلیدی: اندوکاردیت عفونی، باکتری، روت کانال تراپی

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال ۱۳۸۴؛ جلد (۲) ۲۳: صفحه ۲۷۳ الی ۲۸۵

مقدمه

اندوکاردیت عفونی بیماری بالقوه خطرناکی بوده (با میزان مرگ و میر ۳۰ درصد) شایعترین بیماری قلبی با منشاء میکروارگانیزم های دهان می باشد^(۱-۴) که ارتباط تعریف شده ای با باکتری های ناشی از اعمال دندانپزشکی دارد. این بیماری در اثر عفونت میکروبی اندوکاردیوم ایجاد می شود و مشخصه آن، وجود ضایعه ای به نام وژتاسیون است^(۱). اغلب محل تشکیل وژتاسیون بر روی دریچه های قلبی است، اما می تواند در

در سال ۱۹۹۲، Talay و همکاران توانستند ژن مربوط به FnBP را در streptococcus Pyogenes شناسایی کرده و سکانس نوکلئوتیدهای آن را مشخص کنند^(۹). Lindgren و همکاران نیز در کاری مشابه، همین ژن را در streptococcus dysgalactiae شناسایی و توانستند مترادف نوکلئوتیدهای آن را مشخص کنند^(۱۰).

در مورد استافیلوکوک ارئوس نیز ژن مربوط به FgBP یا همان کلامپینگ فاکتور (clumping factor clfA) توسط McDevit و همکاران در سال ۱۹۹۴ شناسایی و مترادف نوکلئوتیدهای آن مشخص شده است^(۱۱).

AL Bate و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش PCR، میکروارگانیزم‌های موجود در کانال ریشه دندانهای عفونی را از نقطه نظر وجود ژن FnBP و FgBP بررسی کردند^(۱۲).

بنابراین با توجه به مشخص بودن میکروارگانیزم‌های اتیولوژیک و شاخص‌های FnBP و FgBP و مترادف نوکلئوتیدهای ژنی هر کدام، انجام آزمایش PCR و طراحی پرایمرها قابل اجرا می‌باشد. اگر چه برای بررسی پروتئین‌های سطحی باکتری‌ها، روشهای متعدد میکروبیولوژیک، سرولوژیک وجود دارد اما هیچکدام از این روشها تا به امروز به اندازه تکنیک PCR دقیق نمی‌باشد^(۱۳).

بنابراین در این تحقیق با توجه به اهمیت اندوکاردیت عفونی و ارتباط آن با درمان‌های دندانپزشکی، به بررسی حضور دو ژن کدکننده شاخص‌های چسبندگی (FnBP, FgBP) در میکروارگانیزم‌های دهان اقدام شد.

هر جای دیگر قلب نیز تشکیل شود^(۲). بعضی از بیماریها نیز مانند بیماری‌های روماتیدی قلبی (rheumatic heart disease) نیز با اعمال استرس‌های سیستمیک باعث آزار و صدمه به دریچه‌های قلبی می‌شوند^(۳-۶).

طبق تقسیم‌بندی Topley (۱۹۹۰)، ارگانیزم‌های اتیولوژیک اندوکاردیت عفونی به سه دسته تقسیم می‌شوند. استرپتوکوک‌های ویریدانس ۶۵ درصد، استافیلوکوک ارئوس ۲۷ درصد و سایر ارگانیزم‌های ۸ درصد^(۵).

اتصال میکروارگانیزم‌ها به بافت بدن میزبان مهمترین ضروری‌ترین پدیده لازم برای وقوع عفونت است. به طور قطع مشخص است که اگر یک باکتری نتواند به بافت میزبان خود اتصال یابد، توسط عوامل بسیاری از جمله جریان خون، تفلس (desquamation) و ... از محیط حذف خواهد شد و شانس عفونت و بیماریزایی خودبخود به میزان قابل توجهی کاهش خواهد یافت^(۷).

استرپتوکوک‌های ویریدانس و استافیلوکوک ارئوس در بیش از ۸۰ درصد موارد عامل اتیولوژیک اندوکاردیت عفونی هستند. آنها با داشتن شاخص‌های سطحی چسبندگی (adhesion)، مانند فیبرینوژن باندینگ پروتئین FgBP و فیبرونکتین باندینگ پروتئین (FnBP) بر روی وژتاسیون مستقر شده و رشد و تکثیر می‌یابند^(۳).

Lowrance و همکاران در سال ۱۹۹۰ با مطالعه‌ای بر روی استرپتوکوک سانگیوس و استافیلوکوک ارئوس، نشان دادند که FnBP می‌تواند در ابتلاء به اندوکاردیت عفونی در موش‌ها نقش اساسی ایفا کند^(۸).

نکروتیک و non - vital، عدم وجود فیستول یا سینوس ترکت، عدم شکستگی های وسیع در ترمیم یا ترمیم با لبه های باز، عدم وجود بیماری های پریودنتال، عدم باز شدگی پالپ، عدم وجود بیماری های سیستمیک و عدم مصرف آنتی بیوتیک در طی دو هفته قبل از نمونه گیری، برای مطالعه برگزیده شدند.

در این تحقیق بطور مشخص از دندانهایی نمونه گیری شد که طی روند طبیعی پوسیدگی دچار عفونت شده و حیات خود را از دست داده بودند. اگر پالپ دندان مثلاً با پوسیدگی باز شده باشد یا دارای سینوس تراکت باشد، این پالپ به تمام فلور دهانی اکسپوز است و میکروارگانیزم های موجود در آن نمی توانند نماینده واقعی میکروارگانیزم هایی باشند که طی روند طبیعی پوسیدگی، دندان را عفونی کرده باشند. از طرف دیگر به علت احتمال درگیری پالپ از طریق بیماری های پریودنتال و کانال های فرعی، دندان هایی که در معاینه دارای آبسه های پریودنتال، درگیری فورکا یا پاکت های عمیق بودند، نیز از مطالعه حذف شدند. به همین منظور انتخاب بیماران در سه مرحله انجام شد.

تاریخچه پزشکی و دندانپزشکی و اظهارات بیمار: پس از مراجعه به پرونده بیمار و ملاحظه طرح درمانی ارائه شده توسط استاد معاینه، از بیمار تاریخچه پزشکی و دندانپزشکی گرفته می شد. هر گونه بیماری سیستمیک یا مصرف آنتی بیوتیک موجب حذف بیمار از مطالعه می شد. تست های حرارتی (تست گرما با گوتاپرکا و تست سرما با یخ) و تست الکتریکی در کنار تست های

اگر ژن های مربوط به FnBP و FgBP در میکروارگانیزم موجود در کانال ریشه دندان های عفونی، پلاک دندانی، پوسیدگی و بزاق بیماران وجود داشته باشد، می توان گفت که در صورت وقوع باکتری می و ورود آنها به خون، احتمال ابتلاء به اندوکاردیت عفونی وجود خواهد داشت. همان طور که قبلاً گفته شد هنوز در انسان هیچ مطالعه ای نتوانسته است ارتباط مستقیم (علت و معلولی) بین میکروارگانیزم های دهان و اندوکاردیت عفونی را به اثبات برساند. بنابراین انجام این تحقیق می تواند ما را تا حدی ولو اندک به این مقصود سوق دهد و راه را برای مطالعات بعدی در زمینه تشخیص، درمان و به خصوص پیشگیری هموار سازد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی حضور دو ژن کد کننده شاخص های چسبندگی (FnBP و FgBP) در میکروارگانیزم های کانال ریشه های عفونی است.

مواد و روشها

این تحقیق توصیفی و روش جمع آوری نمونه ها بصورت تصادفی ساده می باشد. بیماران بزرگسال مراجعه کننده به بخش اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در طی سال تحصیلی ۸۱-۸۰ و طبق معاینه اساتید بخش، به درمان ریشه (RCT) نیاز داشتند، مورد بررسی های اولیه قرار گرفتند. سپس از بین آنها تعداد ۱۵ بیمار به ترتیب مراجعه به بخش و با شرایط زیر انتخاب و در مطالعه شرکت داده شدند. بیماران براساس داشتن یک دندان پوسیده (اولیه، ثانویه)

paper point به کمک یک پنس استریل با احتیاط و بدون خونریزی وارد شیار لثه می شد و به مدت ۵ ثانیه در محل باقی می ماند. سپس از محل برداشته شده و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی سرم فیزیولوژی منتقل می شد^(۱۲).

نمونه‌گیری از پوسیدگی نیز بدون هرگونه استریلیزاسیون اولیه صورت می گرفت. بدین ترتیب که ابتدا با استفاده از سوند و اکسکاویتور خورده‌های غذایی و دبری‌های احتمالی برداشته و محل چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو و با گلوله‌های پنبه خشک می شد. در ادامه ضمن کنترل بزاق (با استفاده از ساکشن و رول پنبه) ابتدا با استفاده از یک اکسکاویتور بزرگ و استریل مقداری از پوسیدگی سطحی کنار زده شده، سپس توسط یک اکسکاویتور کوچکتر از محل پوسیدگی (infected dentin) یک تکه کوچک جدا کرده و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی سرم فیزیولوژی منتقل می شد.

برای نمونه‌گیری از کانال، از روش پیشنهادی Dahlen and Moller (۱۹۹۲) استفاده شد^(۱۳،۱۴). مواد آنتی‌سپتیک بکار رفته در این روش هیدروژن پراکساید ۳۵ درصد و تنتورید ۲/۵ درصد می باشد. ابتدا دندان مورد نظر با استفاده از رادبردم از محیط دهان ایزوله می شد. سپس محدوده کار (دندان، کلامپ و اطراف آن) توسط پنبه آغشته به هیدروژن پراکساید ۳۵ درصد چندین بار شستشو داده شده، پس از اینکه تشکیل حباب (bubbling) متوقف شد، محدوده کار این بار توسط

لمس و دق به دقت در مورد دندان مورد نظر انجام می شدند.

از ۱۵ بیمار انتخاب شده، ۴۸ نمونه تهیه شد. نمونه‌ها پس از تکمیل پرسشنامه، به ترتیب از بزاق، شیار لثه (پلاک دندانی)، پوسیدگی و کانال ریشه دندان مورد نظر تهیه شدند.

لازم به یادآوری است که نمونه‌گیری از بزاق، شیار لثه و پوسیدگی، از اهداف فرعی این مطالعه بوده، بنابراین به علت محدودیت در انتخاب بیمار، زمان و هزینه بالایی مواد مصرفی، فقط در ۱۱ بیمار از ۱۵ بیمار انجام شد و در نهایت ۴۸ نمونه برای انجام تست PCR به آزمایشگاه منتقل شدند. گفتنی است که از ۱۵ دندان مورد مطالعه هفت دندان مولر اول بالا، ۵ دندان مولر اول پایین و ۳ دندان مولر دوم بودند.

قبل از هر گونه استفاده از مواد آنتی‌سپتیک، از بیمار خواسته می شد تا بزاق خود را در کف دهان جمع کرده و نگاه دارد. سپس توسط یک سرنگ استریل (بدون سر سوزن) و بدون تماس با مخاط، به اندازه ۱ سی‌سی بزاق جمع آوری و به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل می شد. قبل از هر گونه استفاده از مواد آنتی‌سپتیک، نمونه‌گیری از شیار لثه (gingival sulcus) و با استفاده از paper point استریل انجام می گرفت. بدین ترتیب که ابتدا توسط ساکشن و رول پنبه جریان بزاق را در کوادرانت مربوطه کنترل کرده، سپس توسط سه عدد paper point استریل از شیار لثه دندان مورد نظر نمونه‌گیری بدقت به عمل می آمد. به همین منظور هر

مراحل لابراتواری

استخراج DNA

کلیه مراحل لابراتواری این تحقیق در بخش انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گرفت. استخراج DNA از نمونه های تهیه شده در سه مرحله صورت گرفت.

۱- مرحله لیز

۲- مرحله جذب مواد آلی

۳- مرحله حذف املاح و تخلیص DNA

جهت انجام واکنش PCR از مواد زیر استفاده شد:

- DNA هدف (template DNA): ابتدا به استخراج نمونه ها پرداخته شد.

- بافر 10XPCR (شامل 100 mM Tris-HCL, 500 mM KCL به میزان ۳ میکرولیتر

- محلول داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) به میزان ۰/۵ میکرولیتر

- کلرومنیزیم (Mgcl2) به میزان ۱/۸ میکرولیتر

- آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر

- پرایمرهای اختصاصی که برای ژن FgBP به میزان ۱/۵ میکرولیتر و برای FnBP به میزان ۱/۵ میکرولیتر استفاده شد.

توالی اولیگونوکلئوتیدهای بکار رفته در پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن FgBP به شکل زیر می باشد.

5'-TTT-ACA-GAA-GAT-GCC-CAA-3'

5'-TTC-CTG-CAA-CGG-TTC-CAA-3'

گلوله پنبه به تنورید ۲/۵ درصد آغشته می شد و برای مدت ۱ دقیقه رها می شود. پس از سپری شدن زمان مذکور از محلول تیوسولفات سدیم ۵ درصد برای خنثی نمودن اثر تنورید ید استفاده می شد. مرحله اول تهیه access cavity آغاز می شد. ابتدا پوسیدگی های سطحی با اکسکاویتور برداشته شده، سپس با استفاده از فرز استریل، تراش دندان تا باقی ماندن یک لایه نازک از عاج در بالای پالپ چمبر پیش رفته و متوقف می شد. لایه باقیمانده و دیواره های اطراف حفره دسترسی مجدداً مانند دفعه اول با مواد آنتی سپتیک ضد عفونی می شدند. در نهایت با تعویض فرز قبلی و استفاده از یک فرز جدید حفره دسترسی تکمیل شد. پس از دسترسی به کانال ریشه ها، ابتدا محوطه پالپ و مدخل کانال ها توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده می شد. سپس با استفاده از یک فایل کوچک وارد کانال دندانی شده، فایل را مختصری حرکت می دهیم تا سرم فیزیولوژی وارد کانال شود. فایل را از کانال ریشه خارج کرده و با استفاده از paper point از محتویات کانال ها نمونه گیری می گرفت. نمونه ها به لوله های اپندورف ۱/۵ سی سی حاوی سرم فیزیولوژی منتقل می شدند.

لازم به توضیح است که در هیچ یک از مراحل بالا برای شستشو یا کنار زدن حباب از پوآر هوا استفاده نشد و هر جا که لازم بود یا از سرنگ شستشو استفاده شد یا اینکه با گلوله پنبه محل را خشک نمودیم. نمونه ها به ترتیب مراجعه بیماران به بخش جمع آوری و برای انجام PCR در فریزر نگهداری می شدند.

شده بود.

به منظور کنترل انجام واکنش PCR، از نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی در هر سری واکنش استفاده شد. نمونه های کنترل مثبت، استرپتوکوک و استافیلوکوک بودند که قبلاً حضور هر یک از ژن های مورد بررسی در آنها محرز شده بود و نمونه های کنترل منفی نیز آنهایی بودند که به جای DNA هدف در آنها از آب استفاده شده بود.

در ضمن برای بررسی cross - reactivity، هر یک از پرایمرها در معرض DNA انسانی (سلولهای اپی تلیالی و بافت ماهیچه قلب) قرار گرفتند ولی در طی آزمایش PCR هیچ بانندی تشکیل نشد.

انجام الکتروفورز و رویت نتیجه PCR

روش مرسوم برای بررسی نتیجه PCR، معمولاً الکتروفورز محصول PCR است. ژل آگاروز و ژل پلی آکریل آمید، متداولترین موادی هستند که در الکتروفورز استفاده می شود. در این تحقیق برای بررسی نتیجه PCR ژل آگارز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها

۹۶ تست PCR به شرح زیر انجام شد:

از ۱۵ بیمار مورد مطالعه ۱۵ نمونه از کانال ریشه تهیه و حضور ژن FnBP در ۱۱ نفر (۷۳/۳ درصد) و ژن FgBP در ۸ نفر (۵۳/۳ درصد) تایید شد. در ۱۱ نمونه تهیه شده از شیار لثه، حضور ژن FnBP در ۸ نفر (۷۲/۷ درصد) و حضور ژن FgBP در ۷ نفر (۶۳/۶

توالی اولیگونوکلئوتیدهای بکار رفته در پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن FnBP به شکل زیر می باشد:

5'-ACC-ATG-CCC-GCT-TAT-ATT-3'

5'-CTC-ATC-AGG-TTG-TTC-AGG-3'

مقدار حجمی آب مقطر دیونیزه براساس غلظت DNA تنظیم شد تا حجم نهایی واکنش ۳۰ میکرولیتر باشد. مواد ضروری در لوله انجام واکنش ریخته شد و در دستگاه ترموسایکلر جهت انجام واکنش PCR قرار داده شد.

انجام واکنش PCR

از ۱۵ بیمار ۴۸ نمونه تهیه شد و چون برای هر نمونه، حضور دو ژن FnBP و FgBP مورد بررسی قرار می گرفت در کل تعداد ۹۶ آزمایش PCR انجام شد.

برنامه انجام PCR برای هر یک از ژن ها، با شرایط زیر و برای ۳۰ سیکل تکراری به حافظه دستگاه ترموسایکلر سپرده شد.

- مرحله Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه
- مرحله Annealing در دمای ۵۶/۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه
- مرحله Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه

البته در شروع هر برنامه یک مرحله Denaturation اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در پایان هر برنامه نیز یک مرحله Extention نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته

در پاتوژنیسیته اندوکاردیت عفونی مطرح می شود و در این میان میکروارگانیسم های دهان شایعترین عوامل ابتلاء به این بیماری به شمار می آیند^(۱۶).

متعاقب بسیاری از اعمال دندانپزشکی، از یک جرمگیری ساده گرفته تا جراحی های وسیع دهان، احتمال وقوع باکتری می وجود دارد. با این وجود در رابطه با احتمال ابتلا به اندوکاردیت عفونی متعاقب درمان های اندودنتیک نظرات متعددی وجود دارد^(۱۷،۱۸). هنوز هیچ مطالعه ای ارتباط مستقیم میکروارگانیسم های کانال ریشه را با اندوکاردیت عفونی نشان نداده است، اما با توجه به بسیاری از تحقیقات مشخص شده است که در چارچوب درمان های اندو از تعیین طول کارکرد گرفته تا آماده سازی کانال و از تزریق PDL گرفته تا بستن رابردم و کلامپ و وج گذاری - احتمال وقوع باکتری می وجود دارد^(۱۸،۱۹).

در تحقیقی که Martin و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام دادند مشخص شد که از ۵۳ بیمار مبتلا به اندوکاردیت عفونی که علیه دندانپزشکان خود طرح دعوی کرده بودند، در هفت بیمار، بدون اینکه قبلاً توسط دندانپزشک معالج خود شناسایی و پروفیلاکسی شوند، متعاقب درمان اندودنتیک اندوکاردیت عفونی رخ داده بود^(۱۶).

Cawson در مطالعه ای نشان داد که در ۵ تا ۱۰ درصد از بیماران مبتلا به اندوکاردیت عفونی سابقه اعمال دندانپزشکی در تاریخچه آنها ذکر شده است^(۲۰).

Debelian و همکاران توانستند پروپیونی باکتریم اکنس را از کانال ریشه و نمونه های خونی تهیه شده در حین و

درصد) به اثبات رسید. در ۱۱ نمونه تهیه شده از پوسیدگی، حضور ژن FnBP در ۵ نفر (۴۵/۵ درصد) و ژن FgBP نیز در ۶ نفر (۵۴/۵ درصد) تأیید شد.

در نمونه های تهیه شده از بزاق بیماران نیز، از ۱۱ نمونه تهیه شده در ۶ نفر (۵۴/۵ درصد) ژن FnBP و در ۴ نفر (۳۶/۴ درصد) نیز ژن FgBP حضور داشتند.

در کل در مورد ۴۸ نمونه تهیه شده، ۹۶ تست PCR انجام شد که حضور ژن FnBP، در ۲۹ نمونه (۶۲/۵ درصد) و ژن FgBP، در ۲۵ نمونه (۵۲ درصد) مثبت گزارش شد. لازم به تذکر است که از ۱۵ بیمار مورد مطالعه ۱۰ نفر (۶۶/۶ درصد) مرد و ۵ نفر (۳۳/۳ درصد) زن بودند.

بحث

اندوکاردیت عفونی بیماری بالقوه خطرناکی است که عدم تشخیص به موقع آن و عدم درمان صحیح آن می تواند به مرگ بیمار منجر شود. در گذشته و قبل از ظهور آنتی بیوتیک ها، بیماری در سرتاسر جهان خطرناک و کشنده بود ولیکن امروزه، به مدد استفاده از آنتی بیوتیکها و درمانهای توام طبی و جراحی، نتیجه و عاقبت بیماری بسیار بهبود پیدا کرده است. با این وجود هنوز ریسک و شانس ابتلاء به این بیمار کاملاً ریشه کن نشده است و آمار حاکی از آن است که حتی شیوع این بیماری هنوز نسبت به دهه ۱۹۴۰ (پیدایش آنتی بیوتیکها) تغییری نکرده است^(۱۵).

باکتری می وقوع آن به عنوان یک پیش نیاز اصلی و مهم

بعد از درمان ریشه جدا کنند^(۱۸،۲۱).

در بررسی های انجام شده بر روی میکروارگانیزم های اتیولوژیک، مشخص شده است که انواع زیادی از باکتریها و سایر میکروارگانیزم ها قادر به ایجاد اندوکاردیت عفونی می باشند. در مورد دریچه های طبیعی، استرپتوکوک ها و استافیلوکوک ها مجموعاً ۹۰-۸۰ درصد موارد بیماری می باشند. از این میان استرپتوکوک های ویریدانس که فلور نرمال و طبیعی دهان به شمار می آیند تمایل خاصی برای اتصال به دریچه های قلب انسان دارند و در ۴۰ درصد موارد شایعترین باکتری ایجاد کننده این بیماری می باشند. بعد از استرپتوکوکها، استافیلوکوک ها در درجه دوم اهمیت قرار دارند و ۳۵ درصد از موارد ابتلا به آنها نسبت داده می شود.

مطالعات نشان داده اند که باکتری های دارای تنفس بی هوازی اختیاری مثل استرپتوکوک ها، لاکتوباسیل ها، استافیلوکوک ها و بعضی از کوکسی های گرم منفی بیش از باکتریهای بی هوازی اجباری از قبیل باکتریوئیدها، اوباکتریها، پرووتلاها، پورفیروموناس ها و پپتواسترپتوکوکها در کانال ریشه عفونی وجود دارد. Moller و Sundqvist به طور جداگانه در مطالعات خود نشان دادند که شایعترین باکتری های جدا شده از کانال ریشه دندان های عفونی شامل استرپتوکوک های ویریدانس، انتروکوک ها و لاکتوباسیل ها می باشند^(۲۱-۲۳). باکتری های بی هوازی اختیاری مثل استرپتوکوکها بیشتر در بخش کرونالی کانال ریشه و باکتری های بی هوازی اجباری مثل کوکسی های گرم منفی یا رادهای گرم منفی در بخشهای

عمیقتر کانال ریشه یافت می شوند. در مطالعات انجام شده توسط Baumgartner و همکاران نیز مشخص شده است که در ۵ میلی متری اپیکال کانال ریشه، بی هوازی های مطلق در مقایسه با بی هوازی های اختیاری از نظر کمی برتری دارند^(۲۴). در مطالعات جدیدتر که از روش بسیار حساس نمونه گیری و کشت در شرایط شدیداً بی هوازی بهره می برند، مشخص شده است که تعداد میکروارگانیزم های بی هوازی اختیاری در مقایسه با بی هوازی های اجباری با گذشت زمان دستخوش تغییر و تحول است. به طوری که در دندانهایی که از عفونت آنها ۳ ماه یا بیشتر گذشته باشد باکتری های بی هوازی مطلق از باکتری های بی هوازی اختیاری پیشی گرفته و به اکثریت خواهند رسید^(۲۳).

با این مقدمه و با توجه به تنوع گونه های باکتریایی در دهان و ارتباط آن با عفونت های کانال ریشه و همچنین باکتری های متعاقب درمان های دندانپزشکی، در این تحقیق ما مشخصاً به سراغ دو فاکتور مهم ویرولانسی در استافیلوکوک ها و استرپتوکوک های پاتوژن اندوکاردیت عفونی رفتیم. در مطالعات انجام شده بر روی پاتوژنز و پاتوفیزیولوژی اندوکاردیت عفونی مشخص شده است که استافیلوکوکها و استرپتوکوکهای پاتوژن با داشتن شاخص های چسبندگی FgBP و FnBP به راحتی می توانند به بافت بدن میزبان و وژتاسیون های قلبی در افراد مستعد متصل شوند و کلونیزه شوند^(۳). Lowrance و همکاران در سال ۱۹۹۰ با مطالعه ای بر روی استرپتوکوک های سانگیوس و استافیلوکوک های ارئوس،

ممکن است حین تهیه اکسس، داخل سیستم پالپی شوند و آن را آلوده کنند و یا در حین آماده سازی کانال وارد جریان خون شوند و یا اینکه در محیط دهان پراکنده شده و سایر نقاط را آلوده نمایند.

در ۱۵ نمونه تهیه شده از کانال ریشه حضور ژن FnBP در ۱۱ مورد (۷۳/۳ درصد) و ژن FgBP در ۸ مورد (۵۳/۳ درصد) تأیید شد. در تنها تحقیق مشابه انجام شده توسط Al Bate و همکاران در سال ۲۰۰۰ که از کانال ریشه ۱۶ بیمار نمونه گیری به عمل آمده بود حضور ژن FnBP در ۸ مورد (۵۰ درصد) و ژن FgBP در ۷ مورد (۴۳/۷ درصد) و با استفاده از تکنیک PCR تأیید شده بود^(۱۲). در مقایسه نتایج این تحقیق با تنها تحقیق مشابه انجام شده، شاهد بالا بودن فراوانی نسبی حضور ژن های مورد بررسی در این تحقیق هستیم. صرف نظر از تفاوت های فردی، نژادی، تفاوت سطح بهداشت دهان و انتخاب بیمار، این تفاوت را چنین می توان توضیح داد که در تحقیق قبلی نمونه ها با واسطه کشت مورد بررسی PCR قرار گرفته بودند که این خود تا حدودی از دقت کار می کاهد چون در حین نمونه گیری و کشت، تعدادی از میکروارگانیزم ها از دست می روند. این در حالی است که ما در تحقیق خود نمونه ها را مستقیماً و بدون واسطه کشت مورد بررسی قرار دادیم که این خود از محسنات این مطالعه و البته از پیشنهادات AL Bate می باشد.

همانطور که قبلاً نیز گفته شد Al Bate در مطالعه خود با پیش فرض وجود استریپتوکوک های فراوانی در شیار لثه یا

نشان داد که FnBP می تواند در ابتلاء به اندوکاردیت عفونی در موش ها نقش اساسی ایفا کند^(۸). Moreillon. نیز در سال ۱۹۹۵ با مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان داد که در استافیلوکوک های جهش یافته که فاقد ژن FgBP هستند در مقایسه با استافیلوکوک های جهش نیافته و واجد ژن مذکور به میزان ۵۰ درصد شانس ابتلا به اندوکاردیت عفونی در موش ها کاهش می یابد^(۲۵). به دلیل اهمیت این دو شاخص چسبندگی (adhesion) در پاتوژن اندوکاردیت عفونی، تحقیقات بعدی به سمت بررسی ژن های کد کننده این پروتئین های سطحی معطوف شد تا اینکه در مطالعات جداگانه توسط Lindgren، Talay و McDevit و ژن های مربوط به FgBP و FnBP شناسایی و ترادف نوکلئوتیدهای آنها مشخص شد^(۹،۱۱،۲۶).

در معالجه ریشه، از روش های شیمیومکانیکی برای دبریدمان و تخریب اکوسیستم میکروبی کانال ریشه استفاده می شود. بنابراین در تعیین طول کارکرد (working length) یا آماده سازی کانال (instrumentation) این احتمال وجود دارد که میکروارگانیزم ها به خون راه یابند^(۷). متعاقب بعضی از اقدامات جنبی دندانپزشکی نظیر بستن رابردم و کلامپ، تزریق PDL یا تهیه فلپ احتمال بروز باکتری می وجود دارد. باکتری های راه یافته به خون بیشتر باکتری های پلاک دندان زيرلثه ای و لثه ای و کمتر باکتری های موجود در پلاک فوق لثه ای هستند.

ضایعه پوسیدگی مملو از باکتری است که این باکتری ها

اندوکاردیت عفونی با منشاء میکروارگانسیم های دهانی- اگر نگوئیم صد درصد- تا حدود زیادی حل خواهد شد. در مورد مثبت گزارش شدن حضور ژن های مورد بررسی نیز فقط به طور قطع و یقین می توان اینگونه اظهار نظر کرد که بعضی از میکروارگانسیم های موجود در نمونه ها، دارای ژن های مربوطه بوده اند و در نتیجه بالقوه پاتوژن می باشند.

نتیجه گیری

پیشگیری از اندوکاردیت عفونی در افراد مستعد یک وظیفه محسوب می شود، ولی مهمتر این است که دندانپزشک هدف پیشگیری از ابتلاء به اندوکاردیت عفونی در همه بیماران نهفته را داشته باشد. لذا رعایت موارد زیر برای جلوگیری از ابتلاء توصیه می شود. ارتقاء آموزش بهداشت، اجتناب از انجام چندین درمان تهاجمی و متعدد، استفاده از دهان شویه قبل از درمان، رعایت ایزولاسیون و استفاده از رابردم، حفظ دقیق طول کارکرد و جلوگیری از آزردهی لثه و تجویز آنتی بیوتیک پروفیلاکتیک و اتخاذ سایر اقدامات پیشگیرانه لازم و ضروری می باشد.

حضور استافیلوکوک ها در مدخل بینی، از این نواحی نمونه گیری انجام داد تا از آنها به عنوان شاهد و کنترل مثبت در کنار نمونه های تهیه شده از کانال ریشه استفاده نماید، اما بعد از استخراج نتایج متوجه شد که در ۱۶ نمونه تهیه شده از شیاری لثه، ژن FnBP فقط در ۸ مورد (۵۰ درصد) و ژن FgBP نیز در ۱۱ مورد (۶۸/۷ درصد) مثبت گزارش شده است. این در حالی بود که در نمونه های کشت شده، میکروارگانسیم ها حضور داشتند ولی در PCR حضور ژن های مذکور در آنها منفی بود. این موضوع چنین توجیه شد که الزاماً تمام سوش های یک گونه از باکتری ها پاتوژن نیستند. این مطلب باعث شد تا ما در تحقیق خود علاوه بر کانال ریشه، از بزاق، پوسیدگی و سایر لثه همان دندان، با اهدافی که قبلاً ذکر شده نمونه گیری نمودیم و فراوانی نسبی حضور ژن FnBP نیز به ترتیب ۳۶/۴ درصد، ۵۴/۵ درصد و ۶۳/۶ درصد بدست آمد. عدم حضور ژن های مذکور در بعضی از نمونه ها، حاکی از عدم حضور میکروارگانسیم های پاتوژن و واجد این ژنها می باشد. این موضوع می تواند زمینه مطالعات بعدی را فراهم کند. مثلاً اگر بتوانیم میکروارگانسیم های دهان را با سوش های غیرپاتوژن و فاقد ژن های مذکور جایگزین کنیم شاید مشکل

References:

1. Mandell GL: Bennett's Principles and Practice of infectious disease. 5th Ed. New York, Churchill Living Stone 2000;Chap65:587-902.
2. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Kameson JL: Harrison's Principles of International Medicine. 15th Ed. McGraw Hill 2000;Chap126:809-816.

3. Moreillon P: Endocarditis and Endarteritis. In: Armstrong D, Cohen J: Infectious Disease. Section 2. *St Louis: The CV. Mosby Co.* 1999;Chap50:1-10.
4. Marsh P, Martin MV: The role of oral bacteria in other infections in: Oral microbiology. **3rd Ed.** London, Chapman & Hall 1992;Chap13:207-11.
5. Topley WWC: Bacteremia, Septicemia and Endocarditis. In: Smith GR, Easmon SF: Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Bacterial Infections. **8th Ed.** London, Arnold 1990:264-86.
6. Levison ME: Infective endocarditis. In: Goldman L, Bennett JC: CECIL textbook of medicine. **1st Ed.** WB Saunders Co. 2000;Chap326:1631-40.
7. Eykyn SJ: Bacteremia, Septicemia and Endocarditis. In: Hausler WJ, Sussman M. Topley and Willson's microbiology and microbial infections. Bacterial Infections. **9th Ed.** London, Arnold 1998;Chap16:277-298.
8. Lowrance JH, Baddour LM, Simpson WA: The role of fibronectin binding in the rat model of experimental endocarditis caused by streptococcus sanguis. *J Clin Invest* 1990;**8**:7-13.
9. Talay SR, Walentin-Weigand P, Jerlstorm PG, Timmis KN: Fibronectin-binding of streptococcus pyogenes: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococcus to epithelial cells. *Infect Immun* 1992;**60**:3837-44.
10. Lindgren POE, McGavin MJ, Signas C, *et al*: Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from streptococcus dysgalactiae, the complete nucleotide domains. *Eur J Biochem* 1993;**214**:819-27.
11. McDevit D, Francois P, Vaundaux P, Foster TJ: Molecular characterization of the clumping factor (fibrogen receptor) of staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 1994;**11**:237-48.
12. Bate AL, Ma JKC, Pittford TR: Detection of bacterial virulence genes associated with infective endocarditis in infected root canals. *International Endodo J* 2000;**33**:194-203.
13. Lodish Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: Molecular cell biology. **4th Ed.** W.H Free man Co. 2000;Chap22:987-89.
14. Dahlen G, Moller AJR: Microbiology of endodontic infections In: Slots J Taubman MA: Contemporary oral microbiology and immunology. **1st Ed.** St Louis, MO, USA, Mosby Year Book 1992;Chap24:444-75.
15. Cowper T: Pharmacological management of the patient with disorders of the cardiovascular system. Infective Endocarditis. *Dent Clin North Am* 1990;**40**:611-47.
16. Martin MV, Butterworth ML, Longman LP: Infective endocarditis and dental practitioner: a review of 53 cases involving ligation. *Br Dental Journal* 1997;**189**:495-8.
17. Bender IB, Montgomery S: Non surgical endodontic procedures for the patient at risk for infective endocarditis and systemic disorders. *J Endod* 1980;**12**:400-7.
18. Debelian GJ, Olsen I, Tronsted L: Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endodontics and Dental Traumatology* 1995;**11**:142-9.
19. Roberts GJ, Gardner P, Simmons NA: Optimum sampling time for detection of dental bacteremia in children. *International Journal of Cardiology* 1992;**35**:311-5.
20. Cawson RA: Infective endocarditis as a complication of dental treatment. *British Dent J* 1981;**151**:409-14.
21. Otten JE, Pelz K, Christmann G: Anaerobic bacteremia following tooth extraction and removal of osteosynthesis plates. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 1987;**45**:477-80.

22. Cohen S, Burns RC, Kettering JD, Torabinejad M: Microbiology and Immunology in: Cohen S, Burns RC: pathways of the pulp. 7th Ed. Mosby Co. 1998;Chap13:463-475.
23. Sundqvist G: Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 1994;**78**:522-530.
24. Baumgartner JC, Falkelr WA: Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991;**17**:380-84.
25. Morellon P, Entenza JM, Francioli P, *et al*: Role of staphylococcus aureus caagolas and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995;**63**:4738-43.
26. Foster TJ, McDevitt D: Surface – associate proteins of staphylococcus aureus, their possible role in virulence. *FEMS Microbiology Letters* 1994;**118**:199-205.