**وزارة التعليم العالي والبحث العلمي**

**جامعة تكريت**

**كلية العلوم**

**قسم علوم الحياة**

# التحري الجزيئي عن فعالية بعض معاجين الاسنان والمضادات الحيوية تجاه بكتريا تسوس الاسنان

**بحث مقدم من قبل الطالبة**

**رحمه إبراهيم عمر**

إلى مجلس كلية العلوم / قسم علوم الحياة / كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في اختصاص علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

**أ.د. قناة محمود عطية**

2026م 1447هـ

**الاهداء**

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيم

﴿وَمَا كَانَ اللَّهُ لِيُضِيعَ إِيمَانَكُمْ﴾ صدق الله العظيم

الحمد لله الذي وفقني لإتمام هذا البحث، وأسأله أن يجعله علمًا نافعًا وخطوةً موفقةً في مسيرتي العلمية.

إلى أمي الغالية، مصدر الدعاء والدعم، التي كان لصبرها وتشجيعها الأثر الكبير في نجاحي، أهدي هذا العمل عرفانًا وامتنانًا

إلى أبي العزيز، الذي علمني معنى الاجتهاد وتحمل المسؤولية، وكان دائمًا سندًا لي، له مني كل الشكر والتقدير.

إلى إخوتي وأخواتي الأعزاء، الذين كانوا مصدر قوةٍ وتحفيز طوال مشواري الدراسي

.وفي الختام، أسأل الله أن يوفقني لما فيه الخير، وأن يكون هذا العمل بدايةً لمستقبل علمي مشرق

# شكر وعرفان

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات، والصلاة والسلام على سيدنا محمد، المبعوث رحمةً للعالمين، وعلى آله وصحبه أجمعين.

أتقدم بأسمى آيات الشكر والعرفان، وخالص التقدير والامتنان، إلى الأستاذة الدكتورة الفاضلة قناة محمود عطية، لما قدمته لي من دعم علمي وتوجيهات سديدة طوال فترة إعداد هذا البحث، فكانت نعم الأستاذة والموجهة، فجزاها الله عني خير الجزاء.

كما أتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى رئاسة وأساتذة قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة تكريت، لما قدموه من دعمٍ علميٍّ ومعرفي، وما وفرته الكلية من بيئة تعليمية ساعدت في إتمام هذا البحث.

لكل من وقف معي بكلمة، أو دعم، أو نصيحة، أقول: جزاكم الله خيرًا، ووفقكم لما يحب ويرضى.

الباحثه

**الخلاصة**

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص بعض البكتيريا المرضية المرتبطة باصابات تسوس الاسنان والتهابات الاسنان ، حيث تم عزل *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus mutans* و *Pseudomonas aeruginosa*، مع دراسة خصائصها المظهرية والكيموحيوية، وتقييم حساسيتها للمضادات الحيوية، إضافة إلى التحري الجزيئي عن بعض جينات الضراوة والمقاومة، وبيان التأثير التثبيطي لعدد من معاجين الأسنان التجارية عليها.

جمعت (15) عينة سريرية من مرضى يراجعون عيادات الأسنان في مستشفى تكريت التعليمي ، أخذت المسحات من مناطق تسوس الأسنان والتهابات اللثة ، ونقلت إلى المختبر خلال مدة لا تتجاوز ساعة واحدة. زرعت العينات على أوساط زرعية انتقائية وتفريقية مناسبة، وحضنت عند 37°م لمدة 24 ساعة، ثم أجريت عمليات التنقية والتشخيص اعتمادًا على الصفات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية القياسية. كما تم اختبار حساسية العزلات لعشرة مضادات حيوية بطريقة الانتشار على وسط مولر–هنتون وفق معايير CLSI، إضافة إلى تقييم الفعالية التثبيطية لخمسة أنواع من معاجين الأسنان بتراكيز (100%، 80%، 60%)، فضلاً عن إجراء التحري الجزيئي عن بعض جينات الضراوة والمقاومة باستخدام تقنية.PCR

فيما يخص نتائج الحساسية للمضادات الحيوية، فقد أظهرت جميع العزلات مقاومة كاملة بنسبة (100%) لكل من Erythromycin و Cefotaximeو Cefiximeو Gentamycinو Amikacinفي الأنواع الثلاثة، مما يدل على محدودية فعالية هذه المضادات ضمن العزلات المدروسة.

أما بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin فقد أظهرت عزلات *Staphylococcus aureus*مقاومة كاملة بنسبة (100%)، في حين أبدت عزلات *Pseudomonas aeruginosa*حساسية تامة بنسبة (100%)، بينما سجلت عزلات *Streptococcus mutans*حساسية جزئية بنسبة (50%) واستجابة متوسطة بنسبة (50%)، مما يشير إلى فعالية متفاوتة لهذا المضاد تبعًا للنوع البكتيري.

وبالنسبة لمضاد Azithromycin فقد أظهرت عزلات *S. aureus*و *P. aeruginosa*مقاومة كاملة بنسبة (100%) ، في حين سجلت عزلات *S. mutans*استجابة متوسطة بنسبة .(100%)

أما مضاد Streptomycin فقد أظهرت عزلات *S. aureus* مقاومة بنسبة (60%) واستجابة متوسطة بنسبة (40%)، بينما أظهرت عزلات *P. aeruginosa* استجابة متوسطة بنسبة (100%)، في حين سجلت عزلات *S. mutans* مقاومة كاملة بنسبة.(100%)

وفيما يتعلق بمضاد Imipenem فقد بلغت نسبة المقاومة في عزلات (80%) *S. aureus* مقابل حساسية جزئية بنسبة (20%)، بينما أظهرت عزلات *P. aeruginosa* استجابة متوسطة بنسبة (100%)، أما عزلات *S. mutans* فقد سجلت مقاومة بنسبة (50%) وحساسية جزئية بنسبة.(50%)

أما مضاد Amoxicillin فقد أظهرت عزلات *S. aureus* و *P. aeruginosa* مقاومة كاملة بنسبة (100%)، في حين سجلت عزلات *S. mutans* حساسية جزئية بنسبة (50%) واستجابة متوسطة بنسبة (50%).

وفيما يخص معاجين الأسنان، فقد أظهر معجون Crest أعلى نشاط تثبيطي ضد *Staphylococcus aureus* عند تركيز 100% بقطر تثبيط بلغ 40 ملم، في حين انخفضت الفعالية إلى 19 ملم عند تركيز 80% و15 ملم عند تركيز 60%، مما يدل على علاقة مباشرة بين التركيز والتأثير المثبط. أما معجون Sensodyne فقد أظهر فعالية محدودة عند تركيز 80% فقط بقطر تثبيط بلغ 15 ملم، بينما لم تُظهر بقية المعاجين Signal ، Kin، Dabur أي نشاط مثبط. كما لم تُظهر أي من المعاجين المختبرة أي تأثير تثبيطي تجاه *P. aeruginosa* أو *Streptococcus mutans* في جميع التراكيز المختبرة، ويعزى ذلك إلى طبيعة هذه البكتيريا وقدرتها العالية على مقاومة العوامل الكيميائية وتكوين الأغشية الحيوية.

أظهرت نتائج التحليل الجزيئي باستخدام تقنية PCR وجود جيني Lip و blaZ في عدد من العزلات، في حين لم يكشف عن وجود جيني mecA و .mph وتشير هذه النتائج إلى ارتباط المقاومة الملحوظة بإنتاج إنزيمات البيتا–لاكتاماز، مع غياب جينات مقاومة الميثيسيلين والأزيثروميسين في العزلات المدروسة.

تؤكد هذه الدراسة الارتفاع الملحوظ في نسب المقاومة الدوائية بين بكتيريا الفم، وتبرز أهمية التشخيص الدقيق والتحري الجزيئي إلى جانب الفحوصات التقليدية، كما تشير إلى أن فعالية معاجين الأسنان تختلف باختلاف تركيبها الكيميائي وتركيز المواد الفعالة فيها، مما يستدعي اعتماد استراتيجيات علاجية ووقائية أكثر دقة للحد من انتشار السلالات المقاومة.

**مشكلة البحث**

تعد العدوى الفموية من المشكلات الصحية الشائعة، وتنتج عن أنواع بكتيرية متعددة مثل *Streptococcus mutans* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*. ومع تزايد مقاومة المضادات الحيوية، تبرز الحاجة إلى عزل هذه البكتيريا وتشخيصها وتحديد أنماط حساسيتها الدوائية لتوجيه العلاج بشكل علمي دقيق.

**أهداف البحث**

1. عزل وتشخيص البكتيريا المسببة للعدوى الفموية.
2. تشخيص البكتريا قيد البحث عن طريقالاختبارات المجهرية والكيموحيوية.
3. تقييم حساسيتها للمضادات الحيوية.
4. تحديد الفعاليه الضد ميكروبيه لبعض معاجين الاسنان تجاه البكتريا المرضيه المسببه لالتهاب اللثه والاسنان.
5. تحديد مدى فعالية المعاجين في إخفاء جينات مقتومة المضادات الحيوية والتحري عن ذلك باستخدام تقنية PCR

## قائمة المحتويات


| رقم الفقرة | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| | الخلاصة | I |
| | مشكلة البحث | III |
| | اهداف البحث | III |
| الفصل الاول | | |
| 1 | المقدمة | 1 |
| الفصل الثاني | | |
| 2 | استعراض المراجع | 4 |
| .21. | بكتريا تسوس الاسنان | 4 |
| .21.1. | المكورات العنقودية Staphylococcus aureus | 4 |
| .21.1.1. | الخصائص العامة Staphylococcus aureus | 4 |
| .21.1.2. | الامراضية | 5 |
| 2.1.2 | العقدية الطافرة *Streptococcus mutans* | 6 |
| 1.2.1.2 | الصفات العامة | 6 |
| 2.2.1.2 | الامراضية | 7 |
| 3.1.2 | بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* | 8 |

| | | |
|---|---|---|
| 1.3.1.2 | الصفات العامة | 8 |
| 2.3.1.2 | الامراضية | 9 |
| 2-3- | معاجين الاسنان | 9 |
| 1.3.2 | البكتري على للمعاجين الاسنان التثبيطي التأثير | 9 |
| 2.3.2 | يساعد معجون الأسنان على تحسين صحة الفم | 11 |
| 3.3.2 | آليات التأثير معجون الأسنان على البكتيريا | 12 |
| 3.3.2 | التأثير الميكانيكي | 12 |
| 2.3.3.2 | التأثير الكيميائي | 12 |
| الفصل الثالث | | |
| .3 | مواد وطرائق العمل | 13 |
| 1.3 | الأجهزة والأدوات المستخدمة | 13 |
| 2.3 | المضادات الحيويةAntibiotics | 14 |
| 3.3 | البادئات Primers | 15 |
| 4.3 | معاجين الاسنان Toothpaste | 15 |
| 2.3 | طرائق العمل Methods | 16 |
| 1.2.3 | التعقيم Sterilization | 16 |
| 2.2.3 | جمع العينات | 16 |
| 3.2.3 | الصفات الزرعية | 17 |

| | | |
|---|---|---|
| 4.2.3 | الفحوصات المجهريةMicroscopic Examination | 18 |
| 1.4.2.3 | الاختبارات الكيموحيوية | 18 |
| 2.4.2.3 | اختبار إنزيم التجلطCoagulase Test | 18 |
| 3.4.2.3 | اختبار الأوكسيديزOxidase Test | 19 |
| 4.4.2.3 | اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Growth on Mannitol Salt Medium Test (MSA Test) | 19 |
| 5.4.2.3 | اختبار الكاتاليزCatalase Test | 19 |
| 6.4.2.3 | فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test | 19 |
| 3.3 | تحضير التخافيف Dilution Preparation لمعاجين الأسنان | 20 |
| 4.3 | التحري عن مدى الحساسية لمنتجات معاجين الأسنان Susceptibility Testing | 21 |
| 5.3 | استخلاص Extraction DNA from Bacteria الدنا من البكتيريا | 22 |
| الفصل الرابع | | |
| .4 | النتائج والمناقشة | 25 |
| 1.4 | التشخيص Identification | 25 |
| 1.1.4 | الفحص المجهريStaphylococcus aureus | 25 |
| 2.1.4 | الفحص المجهريPseudomonas aeruginosa | 25 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.1.4 | الفحص المجهري – *Streptococcus mutans* | 25 |
| 4.1.4 | الفحص الكيموحيوي | 26 |
| 2.4 | نتائج التحليل الجزيئي للجينات باستخدام تقنيةPCR | 37 |
| الفصل الخامس | | |
| .5 | الاستنتاجات والتوصيات conclusions and recommendation | 39 |
| 1.5 | الاستنتاجاتconclusions | 39 |
| 2.5 | التوصياتrecommendation | 40 |
| | المصادرReferences | 41 |

## قائمة الجداول


| رقم الجدول | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | الأجهزة والأدوات التي استعملت في التجارب العلمية | 13 |
| 2 | المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة المجهزة من شركة Bioanalyse التركية | 14 |
| 3 | البادئات المستخدمة في الدراسة | 15 |
| 4 | المعاجين المستخدمة في الدراسة والشركة المصنعة لها | 15 |
| 5 | البادئات المستخدمة في الدراسة | 23 |
| 6 | نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية | 26 |
| 7 | نتائج العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Antibiotic كنسب مئوية | 28 |
| 8 | نتائج العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Antibiotic | 29 |
| 9 | نتائج فعالية معاجين الاسنان | 32 |

## قائمة الصور


| رقم الصورة | العنوان | رقم الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | نتيجة اختبار تخمر سكر المانيتول لبكتريا *Staph. aureus* و تحول الوسط للون الاصفر. | 27 |
| 2 | نتائج اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية على وسط اكار مولر هنتون للعزلات قيد البحث | 31 |
| 3 | نتائج اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية على وسط اكار مولر هنتون البحث | 32 |
| 4 | نتائج اختبار معاجين الاسنان على وسط اكار مولر هنتون | 36 |
| 5 | نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج PCR للعينات قيد الدراسة | 37 |

# الفصل الاول

## 1- المقدمة Introduction

يعتبر تسوس الأسنان أكثر الأمراض الفموية انتشارا في العالم، حيث يصيب ما يقرب من 2.5 مليار بالغ وأكثر من 570 مليون طفل. إنها حالة متعددة العوامل وديناميكية تنتج عن اضطراب في التوازن البيئي للغشاء الحيوي الفموي، ويرجع إلى حد كبير إلى تناول السكريات والكربوهيدرات القابلة للتخمير بشكل متكرر(Barbosa *et al.*, 2020; Pintado-Palomino *et al.*, 2022) تشكل التفاعلات المعقدة بين العوامل المرتبطة بالمضيف والميكروبات النافعة الفم تطور تسوس الأسنان. إذا تركت الآفة دون علاج، قد تتطور الآفة نحو لب الأسنان، مما يؤدي إلى عدوى اللب، وتدهور الهيكل، وربما تدمير كامل للأسنان .(Pitts *et al.*, 2021)

يتم التوسط بشكل أساسي في تسوس الأسنان من خلال إزالة المعادن الناتجة عن الحمض من المينا. تنتج هذه الأحماض عن طريق الأيض البكتيري للسكريات الغذائية داخل اللويحات السنية . إزالة المعادن من المينا تتضمن فقدان أيونات الكالسيوم والفوسفات وتمثل خطوة مركزية في تكوين التجويف *(Ganss et al., 2022).* لذلك، فإن التحكم في الأغشية الحيوية البكتيرية على أسطح الأسنان أمر حاسم لمنع تقدم التسوس والمضاعفات اللاحقة *(Pintado-Palomino et al., 2022).*

في السنوات الأخيرة، تم الإبلاغ عن زيادة انتشار تآكل الأسنان التآكلي، مما أثار قلقا سريريا ملحوظا (Machiulskiene *et al.*, 2020)يرتبط هذا المرض بفقدان تدريجي للأنسجة الصلبة في الأسنان بسبب الكشط الميكانيكي — مثل تنظيف الأسنان بقوة — أو التآكل الكيميائي الناتج عن الأحماض الموجودة في تجويف الفم (Schlüter & Amaechi, 2023)يمكن أن تنشأ هذه الأحماض من مصادر خارجية، مثل المشروبات الغازية، ومشروبات الطاقة، والعصائر المعتمدة على الحمضيات، أو من مصادر داخلية مثل حمض المعدة لدى مرضى ارتجاع المريء ( Mulic *et al.*, 2021)مع مرور الوقت، يؤدي التعرض

المستمر لهذه العوامل التآكلية إلى تدهور لا رجعة فيه في المينا والعاج، مما يضر في النهاية بسلامة ووظيفة الأسنان (Schlüter & Amaechi, 2023)

اشارت المصادر الى انتشار تآكل الأسنان التآكلي، مما أثار قلقا سريريا كبيرا. ويرتبط هذا المرض بالتدهور التدريجي للأنسجة الصلبة في الأسنان بسبب الاحتكاك الميكانيكي — مثل التنظيف القوي — أو التآكل الكيميائي الناتج عن الأحماض في تجويف الفم قد تنشأ هذه الأحماض من مصادر خارجية، مثل المشروبات الغازية والمشروبات المعتمدة على الحمضيات، أو من مصادر داخلية مثل الارتجاع المعدي، مما يساهم في النهاية في التحلل التدريجي للمينا والعاج (Mulic *et al.*, 2021)

يعتبر المكورات العقدية الطافرة العامل الرئيسي للسبب لتسوس الأسنان. هذا الكائن يستعمر الأنسجة الصلبة للأسنان. يخل التوازن البيئي الحيوية الفموية، ويبدأ إزالة المعادن من المينا عن طريق إنتاج أحماض عضوية تستنزف أيونات الكالسيوم والفوسفات. تؤدي هذه العمليات إلى آفات مزخرفة تؤثر على الحفر والشقوق والأسطح الملساء (Pintado-Palomino *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2020)

كما أظهرت الأبحاث تفاعلات تنافسية بين أنواع البكتيريا، مما يشير إلى أن التحولات داخل الميكروبيوم الفموي قد تحدث حتى قبل ظهور الآفات السريرية (Barbosa *et al.*, 2020)

تعتبر الكائنات الدقيقة الأخرى، بما في ذلك *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa*، مسببات أمراض انتهازية. على الرغم من أنها ليست المبدرات الأساسية لتسوس الأسنان، إلا أنها قد تساهم في تفاقم التهابات الفم—خاصة لدى الأفراد الذين يعانون من ضعف المناعة، أو آفات تسوس عميقة، أو التهاب اللثة المزمن تظهر هذه الكائنات مقاومة ملحوظة للمضادات الحيوية وزيادة في البقاء في بيئات الفم، مما قد يزيد من تفاقم العدوى الثانوية؛ ومع ذلك، يظل دورها داعما وثانويا لدور S. mutans المهيمن في السرطان (Pitts *et al.*, 2021).

ان معجون الأسنان هو تركيبة هلامية تستخدم مع فرشاة الأسنان لتنظيف الأسنان، وتحسين المظهر، والحفاظ على صحة الفم. يلعب دورا مركزيا في ممارسات نظافة الفم اليومية، حيث ترتبط بكتيريا الفم ارتباطا وثيقا بتكون اللويحات وتسوس الأسنان وألم الأسنان. بينما يعد تسوس الأسنان مرضا يمكن الوقاية منه، تظل عادات النظافة الشخصية الفعالة—وخاصة تنظيف الأسنان بالفرشاة—هي الاستراتيجيات الوقائية الأكثر كفاءة وسهولة (Machiulskiene *et al.*, 2020). يعد النشاط المضاد للبكتيريا لمعجون الأسنان عاملا رئيسيا في فعاليته السريرية. تم دمج عوامل مضادة للميكروبات مختلفة في تركيبات معجون الأسنان لتعزيز صحة الفم، وتم تقييم فعاليتها ضد مسببات الأمراض الفموية الشائعة، خاصة في الدول النامية (Barbosa *et al.,* 2020)

ان مرض تسوس الاسنان يرتبط بشكل كبير بثلاث فئات رئيسية: تراكم اللويحات، تسوس الأسنان، وأمراض اللثة. تتكون اللويحة السنية من طبقة حيوية ميكروبية منظمة مدمجة داخل مصفوفة عضوية تلتصق بأسطح الأسنان، خاصة بالقرب من منطقة عنق الرحم. يرتبط تراكم اللويحات ارتباطا وثيقا بالتهاب اللثة، وأمراض اللثة، وتسوس الأسنان (Gans *et al.*, 2022) يبقى إزالة البلاك الميكانيكي عبر الفرشاة — إلى جانب استخدام معجون الأسنان المضاد للميكروبات وغسول الفم — الطريقة الأساسية للوقاية من هذه الحالات (Pitts *et al.*, 2021).

# الفصل الثاني

## 2. استعراض المراجع

### 1.2. بكتريا تسوس الاسنان

#### 1.1.2. المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus*

##### 1.1.1.2. الخصائص العامة *Staphylococcus aureus*

تم اكتشاف الكائنات الحية الدقيقة التابعة لجنس *Staphylococcus* لأول مرة عام 1870 على يد السير ألكسندر أوغستون (1844–1929)، الذي فحص بواسطة المجهر الضوئي القيح المُفرغ من جرح في ساق رجلٍ شاب.(Salh *et al*.,2022)

تُعد بكتيريا *Staphylococcus aureus* من الجراثيم موجبة الغرام، كروية الشكل، تُرتب في مجموعات عنقودية، وهي اختيارية الهوائية، غير متحركة وغير مكوّنة للأبواغ، وتتميز بقدرتها على إنتاج إنزيمي الكاتالاز والكواغولاز. تستعمر هذه البكتيريا عدة مواقع في جسم الإنسان، أهمها الأنف، والأمعاء، والجلد خصوصاً في المناطق الرطبة مثل الإبطين والفخذين، إضافة إلى البلعوم وأحياناً المهبل، إذ تبلغ نسبة الحَمل الدائم لها بين 20–30% من الأفراد، في حين أن السلالات المقاومة للميثيسيلين (MRSA) توجد لدى نحو 1–3% من السكان. تمتلك المكورات العنقودية الذهبية عوامل ضراوة متعددة تشمل بروتينات الالتصاق مثل ClfA و ClfB وحمض التيكويك، ونظام التحسس الجماعي Agr الذي ينظم إنتاج السموم وعوامل الالتصاق، فضلاً عن قدرتها العالية على التهرب من جهاز المناعة. وتُظهر أعدادها في الأنف تراوحاً بين (2^10–6^10) وحدة تكوين مستعمرة لكل مسحة، وفي الأمعاء بين (6^10–7^10) لكل 100 غرام براز، بينما تكون نادرة على الجلد السليم. تسبب هذه البكتيريا طيفاً واسعاً من الأمراض، بدءاً من التهابات الجلد والجروح، مروراً بتجرثم الدم والالتهاب الرئوي والتهابات البطن، وصولاً إلى دورها في تفاقم الإكزيما، كما تُعد مقاومتها العالية للمضادات الحيوية، خصوصاً في سلالاتMRSA

وتنمو في أنواع مختلفة من الأوساط الزرعية بمستعمرات ذات صفات مختلفة تتراوح بين اللون الأبيض، والأصفر الداكن إلى الذهبي وتمتاز بخلايا كروية الشكل قطرها يتراوح بين (1.5 – 0.5) مايكرومتر، وتنقسم بأكثر من مستوى واحد، وتبقى ملتصقة مع بعضها البعض في تجمعات غير منتظمة تُشبه عناقيد العنب. كما يمكن مشاهدتها على هيئة خلايا مفردة، أو أزواج أو رباعيات أو سلاسل قصيرة، خصوصاً في المستنبتات السائلة. إلى جانب ذلك، تصف هذه البكتيريا بنشاطها الأيضي العالي، فهي تنمو على درجة حرارة 37° مئوية إلا أن إنتاجها للصبغات يتم بشكل أفضل عند درجة حرارة الغرفة، كما أن معظم سلالاتها تنمو بوجود 10% من كلوريد الصوديوم وضمن درجة حرارة تتراوح بين (18 – 40)° مئوية كما تُعد المكورات العنقودية موجبة لصبغة غرام، ومنتجة للكاتالاز، وغير منتجة للاوكسيديز (Rezaei *et al*., 2023)

**2.1.1.2. الامراضية**

تُعدّ بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من أكثر مسبّبات الأمراض انتشاراً على مستوى العالم من حيث معدلات الإصابة والوفيات الناتجة عن العدوى. يمكن لهذا الممرض أن يتسبب في مجموعة واسعة من الأمراض (Lemos *et al*., 2019) قد يكون علاج العدوى العنقودية صعبًا،ممكن لهذا الممرض أن يستعمر الجلد، والتجويف الأنفي، والأمعاء لدى الإنسان دون التسبب بأعراض .ويُستعمر الأنف من قبل *Staph. aureus* لدى حوالي 30–20٪ من البشر، مما يجعلها بكتيريا انتهازية يمكن أن تسبب العدوى لاحقًا. إن قدرتها العالية على الانتقال الصامت من خلال الاتصال البشري يجعل من الصعب القضاء عليها(Yamazaki *et al*., 2024) . وعلى الرغم من أن فتحات الأنف الأمامية تُعد الموقع الأساسي لاستعمار *S. aureus* ، إلا أن التجويف الفموي يمكن أن يستعمر أيضًا بواسطة هذه البكتيريا بنسبة مرتفعة قد تصل إلى 84٪. يحتوي الفم على ميكروبيوم متنوع جدًا، وخصائصه كموقع بيئي ميكروبي ديناميكي تتحكم في نوعية البكتيريا القادرة على البقاء، لذلك يمكن فقط لبعضها الاستعمار في الفم وقد تم

العثور على *Stap . aureus* في عدة مواقع داخل الفم، مثل الغشاء المخاطي الفموي، والسطح الظهري للسان، واللويحة السنية، واللعاب، وسطح أطقم الأسنان، والتهاب الشفة، وحتى في جيوب اللثة وعلى الرغم من أن وجود *Staph. aureus* في الميكروبيوم الفموي يُعتقد أنه ناتج عن الهجرة من التجويف الأنفي، إلا أن هذا الأمر لا يزال غير مؤكد وقد أظهرت بعض التقارير أن التجويف الفموي يمكن أن يشكل مستودعًا مستقلاً لبكتيريا*Staph. aureus* ، وله دور حاسم في انتشارها إلى أماكن أخرى في الجسم، مثل مجرى الدم أو الرئتين(Chmielewski, M,2024) .

### 2.1.2 العقدية الطافرة *Streptococcus mutans*

#### 1.2.1.2 الصفات العامة

تعد *Streptococcus mutans* بكتيريا متعايشةCommensal في تجويف الفم. وتُعرف *S. mutans* بأنها واحدة من البكتيريا الرئيسية المسببة لتسوس الأسنان، وخاصةً في حالات التسوس على الأسطح الملساء للأسنان(Lemos *et al*., 2019) .

من بين أكثر الأنواع انتشارًا من العقديات الفموية المعزولة هي *Streptococcus mutans*، والتي تلعب دورًا جوهريًا في الإصابة بالأمراض الفموية، بما في ذلك أمراض اللثة (periodontal diseases) (Rezaei *et al*., 2023).

يُعَدّ جنس المكورات السبحية *Streptococcus mutans* ، الذي وصفه روزنباخ عام 1884، من مسببات الأمراض الهامة التي تُؤثّر بشدة على صحة الإنسان(Rosenbach, 1884) .

ووفقًا للتصنيف الوارد في دليل بيرجي للتعرف على البكتيريا (الطبعة التاسعة)، فان جنس جنس *Streptococcus*يشمل مجموعات البكتيريا المكوّرة القيحيةpyogenic، والشفويةoral ، واللاهوائية anaerobic، بالإضافة إلى مجموعة أخرى من بكتيريا المكورات السبحية ، حيث انها خلايا كروية أو بيضاوية الشكل، يتراوح قطرها من 0.5 إلى 2.0 ميكرومتر، وتظهر في أزواج أو سلاسل عند نموها في

أوساط سائلة، تكون موجبة لصبغة كرام ،الأيض لدى هذه البكتيريا هو تخمّري، حيث تظهر بشكل رئيسي حمض اللاكتيك دون تكوّن غازات. بكتيريا الستربتوكوكس سالبة لإنزيم الكاتالاز، وغالبًا ما تُهاجم خلايا الدم الحمراء، مسببةً إما تغيرًا أخضر اللون) انحلال دموي (α أو تصفية تامة) أيضًا يُشار إليها بـ-α الانحلال الدموي. درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37درجة مئوية، وعادة ما يكون نموها محصورًا بين 25إلى 45 درجة مئوية.(Ajdić *et al.,* 2002) .

**2.2.1.2 الامراضية**

تلعب *Streptococcus mutans* دورًا أساسيًا في إصابة الأمراض الفموية، بما في ذلك أمراض اللثة حيث يمكن للبكتيريا المكونة للأغشية الحيوية أن تسبب التهاب اللثة .(Marsh, 2006)

، وهو مرض التهابي ناتج عن العدوى في اللثة، والعظم المحيط بالسن، والنسيج الضام الأساسي لذلك، فهو مشكلة صحية عامة شائعة بين الأطفال والبالغين .(Pintado-Palomino *et al.,* 2022) تشمل أسباب مرضية S. mutans تكوين الأغشية الحيوية، وتغيرات في عدة بروتينات، وتكوين السكريات الخارجية متعددة السكاريد، وإنتاج الحمض، والتي تؤدي إلى تآكل مينا الأسنان وتسوسها (Rezaei *et al*., 2023). فتمتلك *Streptococcus mutans* العديد من الهياكل البيولوجية السطحية المختلفة التي تلعب دورًا رئيسيًا في مسببّات الأمراض الفموية والجهازية. على سبيل المثال، يُعتبر بوليمر رامنوز–جلوكوز (RGP) المسؤول عن الأنماط المصلية المختلفة لـ *S. mutans*، في حين تُعد إنزيمات الجلوكوزيل ترانسفيراز، ومضادات البروتين، وبروتياز ربط متعدد السكاريد هي المضادات البروتينية السطحية الرئيسية لـ *S. mutans*، والتي تُعد ضرورية لبعض المراحل في العملية المرضية ، بالإضافة إلى ذلك، يحتوي *S. mutans* على العديد من جزيئات الالتصاقadhesins ، حيث يعتبر التصاق *S. mutans* في التجويف الفموي عاملاً رئيسيًا في تطور تسوس الأسنان(*Li et al*., 2021) ، أما في الأمراض الجهازية، فإن جزيئات الالتصاق تمثل ميزة مهمة لاستعمار العائل(Fang *et al*., 2024) .

### 3.1.2 بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.3.1.2 الصفات العامة

كان الطبيب العسكري الفرنسي شارل–إيمانويل سيديلو (Charles-Emmanuel Sédillot)أول من أشار إلى عدوى تتضمن *Pseudomonas aeruginosa* في عام 1850. فقد لاحظ سيديلو أن الضمادات الجراحية للمرضى سواء في ساحات القتال أو في المستشفيات غالبًا ما تكتسب لونًا أزرق–أخضر وتصدر رائحة حلوة تشبه رائحة العنب، وهي السمات التشخيصية التي نعرفها اليوم كعلامات مميزة لعدوى *P. aeruginosa*، نتيجة لإنتاج مركب بايوسيانين (Pyocyanin) و-2أمينوأستوفينون على التوالي(Wood *et al*., 2023)

تعد *Pseudomonas aeruginosa*بكتيريا سالبة الغرام هوائية وذات شكل عصوي ، ويمكن عزلها من معظم البيئات، بما في ذلك التربة والنباتات وأنسجة الثدييات, تمتلك هذه البكتيريا القدرة على البقاء على الماء والأسطح المختلفة والأجهزة الطبية من خلال عوامل الارتباط الفعّالة التي تمتلكها، مثل الأسواط Flagellaوالأهداب Pili والأغشية الحيوية Biofilms لذلك نتشر *P. aeruginosa* بكثرة في البيئات الطبيعية والصناعية، بما في ذلك البحيرات، المستشفيات، ومصارف أحواض المنازل (Tuon *et al*., 2022). ويُعزى هذا النجاح البيئي في المقام الأول إلى مرونتها الأيضية، وقدرتها العالية على التكيف مع الظروف البيئية المتغيرة، وكذلك قدرتها على البقاء في البيئات القاسية (Krell, 2024) .وتمتلك هذه البكتيريا مقاومة ذاتية للمضادات الحيوية، ويُعزى ذلك إلى انخفاض نفاذية جدارها الخلوي، ووجود مضخات طرد متعددة وإنزيمات تعديل المضادات الحيوية، إضافةً إلى قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية Biofilmsويمكن أن تكتسب مقاومة إضافية للمضادات الحيوية من خلال الطفرات الجينية أو النقل الجيني الأفقي(Krell, 2024)

### 2.3.1.2 الامراضية

تُعد *Pseudomonas aeruginosa* بكتيريا سالبة الغرام انتهازية واسعة الانتشار في الطبيعة، وقد ثبت تورطها في مجموعة متنوعة من العدوى المكتسبة من المجتمع أو المستشفيات، بما في ذلك الالتهاب الرئوي، التليف الكيسي، التهابات المسالك البولية، وعدوى الحروق .(Al-Dahmoshi *et al*., 2021) قد تكون العلاجات المضادة للميكروبات المستخدمة سريريًا غير فعالة ضد عدوى *P. aeruginosa*، نظرًا لقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية .(Azam and Khan, 2019)إذ يساعد تكوين الأغشية الحيوية هذه البكتيريا على مقاومة الظروف البيئية الضارة، ويعزز استعمارها للأنسجة المضيفة، كما يمكن أن تعمل الأغشية الحيوية كـ حواجز انتشار تمنع وصول المضادات الحيوية إلى الخلايا البكتيرية (Yin *et al.,* 2022)ونظرًا لكون *P. aeruginosa*أحد أهم الممرضات الانتهازية لدى الإنسان، فقد أصبح علاجها والسيطرة عليها تحديًا سريريًا كبيرًا وموضوعًا لعدد كبير من الدراسات البحثية إذ يسهم تكوين الغشاء الحيوي في تعزيز استعمار البكتيريا ورفع مقاومتها للعوامل المضادة للميكروبات والتصدي لاستجابات الجهاز المناعي وبالتالي، فإن العلاج التقليدي بمضاد حيوي واحد يعد محدود الفعالية ضد العدوى المرتبطة بالأغشية الحيوية، مما أدى إلى تزايد الدراسات التي تبحث في تطوير أدوية مضادة جديدة وبرامج علاج مضاد للأغشية الحيوية للتعامل مع عدوى *P. aeruginos* (Tuon *et al.,* 2022) .

## 2-3- معاجين الاسنان

### 1.3.2 التأثير التثبيطي للمعاجين الاسنان على البكتريا

يؤثر معجون الأسنان في البكتيريا الفموية عبر مسارين أساسيين: الأول ميكانيكي يتمثل في إزالة الغشاء الحيوي (الطبقة الجرثومية) بواسطة التفريش والمواد الكاشطة، والثاني كيميائي يعتمد على مكونات فعالة تحدّ من تكاثر البكتيريا أو نشاطها. فالفلورايد يثبط النشاط الأيضي للبكتيريا، في حين تعمل بعض المواد المضادة للميكروبات على القضاء عليها مباشرة. كما تحتوي بعض التركيبات على مركبات موجهة

تستهدف سلالات محددة مرتبطة بتسوس الأسنان أو أمراض اللثة. وبوجه عام، لا تتمثل الوظيفة الأساسية لمعجون الأسنان في قتل البكتيريا مباشرة، بل في تعطيل البنية المنظمة للغشاء الحيوي الذي يتيح للبكتيريا الضارة الاستمرار في النمو. إذ يؤدي التفريش إلى إزالة هذا الغشاء ميكانيكيًا من سطوح الأسنان واللثة، بينما تعزز المواد الكاشطة من تفكيكه. وتضم العديد من معاجين الأسنان الفلورايد، الذي يسهم في تقوية مينا الأسنان والحد من حدوث التسوس. ومن المهم الإشارة إلى أن الفلورايد لا يقضي على البكتيريا بصورة مباشرة، لكنه يحدّ من قدرة البكتيريا المنتجة للأحماض – مثل العقدية المتحولة، وهي عنصر محوري في عملية التسوس – على إحداث الضرر. بعض المنتجات تحتوي كذلك على عوامل مضادة للبكتيريا، مثل التريكلوسان (الذي حُظر في بعض الدول بسبب مخاوف تتعلق بالسلامة) أو بدائل أحدث كفلوريد القصدير ومركبات الزنك. وتشير دراسة (Di Stefano, *et.al*.,2022) إلى أن هذه المواد تستهدف البكتيريا الضارة، إلا أن هناك نقاشًا علميًا حول احتمال تأثيرها في الكائنات الدقيقة النافعة أيضًا.(Parsaei *et al.,* 2022) ورغم الانتشار الواسع لاستخدام معجون الأسنان يوميًا، فإن فهم تأثيره في الميكروبيوم الفموي ما يزال قيد التطور. فقد أوضحت بعض الدراسات أن العوامل المضادة للبكتيريا قد تقلل من أعداد البكتيريا الضارة والمفيدة على حد سواء، مما قد يؤدي إلى تغيرات في توازن الميكروبيوم لم تتضح أبعادها بالكامل بعد. في المقابل، تشير دراسات أخرى إلى أن الميكروبيوم الفموي يستعيد توازنه بسرعة بعد التفريش، مما يجعل هذا التأثير مؤقتًا.(Kanouté *et al*., 2022)

ويتجه البحث العلمي حاليًا نحو تطوير تركيبات أكثر انتقائية، تستهدف الميكروبات الضارة مع الحفاظ على الأنواع المفيدة. كما يجري استكشاف دور البروبيوتيك والبريبايوتكس كمكونات يمكن أن تدعم توازن الميكروبيوم الفموي بدلًا من مجرد تقليله .إن الحفاظ على توازن الميكروبيوم الفموي لا يقتصر على الوقاية من تسوس الأسنان فحسب؛ إذ تتزايد الأدلة التي تربط أمراض اللثة بحالات جهازية مثل أمراض القلب والسكري ومضاعفات الحمل. ويمكن للالتهاب الناجم عن البكتيريا الفموية الضارة أن يمتد بتأثيراته خارج

التجويف الفموي، بما قد يسهم في مشكلات صحية بعيدة المدى. ومن المتوقع أن تتجه الابتكارات المستقبلية في معاجين الأسنان نحو صيغ أكثر توافقًا مع الميكروبيوم، غير أن التوصية الحالية تبقى ثابتة: تنظيف الأسنان مرتين يوميًا باستخدام معجون يحتوي على الفلورايد، مع تنظيف المسافات بين الأسنان يوميًا (Di Stefano, *et.al*.,2022).

**2.3.2 يساعد معجون الأسنان على تحسين صحة الفم**

يسهم توازن الميكروبيوم الفموي في تعزيز صحة الفم بصورة عامة، إذ يساعد وجود مجتمع ميكروبي مستقر على الحد من تكاثر الأنواع الممرِضة. وفي هذا السياق، تعمل البروبيوتيك على كبح نمو البكتيريا المرتبطة بمشكلات مثل رائحة الفم الكريهة، وتراكم اللويحة السنية، وأمراض اللثة، كما أظهرت فائدتها في تقليل الالتهاب المزمن وتحسين المؤشرات السريرية لصحة الفم.(Maier, 2023)

عادةً ما تحتوي معاجين الأسنان التقليدية على الفلورايد، الذي يحدّ من نشاط البكتيريا المسببة للتسوس ويسهم في تقليل تكوّن البلاك. في المقابل، فإن معجون الأسنان البروبيوتيكي غالبًا لا يضم الفلورايد، بل يعتمد على إدخال سلالات من البكتيريا النافعة إلى البيئة الفموية بهدف تعزيز نمو الأنواع المفيدة ودعم التوازن الميكروبي. كما تتضمن بعض هذه التركيبات مواد بريبايوتيك تُستخدم كمغذيات انتقائية لتعزيز تكاثر البكتيريا المفيدة.(Murugesan *et al.*, 2025) وتشير بعض الدراسات إلى أن معجون الأسنان الحيوي قد يدعم الاستجابة المناعية الموضعية في الفم، وقد يكون مفيدًا للأشخاص الذين يتناولون مضادات حيوية، نظرًا لدوره المحتمل في المساعدة على استعادة التوازن الميكروبي الفموي. ومع ذلك، ورغم أهميته في دعم صحة الأسنان واللثة، لا تتوافر أدلة كافية تثبت إمكانية اعتماده بديلًا عن مكملات البروبيوتيك الفموية المخصصة لإعادة توازن ميكروبيوم الأمعاء.

يحتوي معجون الأسنان البروبيوتيكي على سلالات بكتيرية نافعة يُفترض أنها تسهم في تحسين صحة الفم، وربما يكون لها تأثير غير مباشر في صحة الجهاز الهضمي، ويتميّز عن المعاجين التقليدية بعدم احتوائه على الفلورايد في كثير من تركيباته.(Teja *et al.*, 2023)

**3.3.2 آليات التأثير معجون الأسنان على البكتيريا**

**1.3.3.2 التأثير الميكانيكي :**تعمل الفرشاة والمواد الكاشطة الموجودة في معجون الأسنان على إزالة الغشاء الحيوي الذي يضم البكتيريا الضارة من سطح الأسنان، مما يقلل من عددها ويمنعها من التكاثر.

**2.3.3.2التأثير الكيميائي:**

الفلورايد: يعمل الفلورايد على تثبيط النشاط الأيضي للبكتيريا الفموية، مما يؤدي إلى تقليل إنتاج الأحماض المسؤولة عن إزالة تمعدن المينا وحدوث التسوس. إضافةً إلى ذلك، يسهم في تعزيز عملية إعادة التمعدن من خلال تعويض المعادن المفقودة من مينا الأسنان وإعادة ترسيبها على سطحها.

**المكوّنات المضادة للبكتيريا:** تحتوي بعض معاجين الأسنان وغسولات الفم على مواد فعالة مثل الكلورهيكسيدين، المعروف بقدرته العالية على خفض أعداد البكتيريا المرتبطة بأمراض اللثة. كما تتضمن بعض المنتجات ذات الطابع الطبيعي مستخلصات نباتية مثل البابونج أو البروبوليس، والتي أظهرت خصائص مضادة للميكروبات .(Qi *et al.*, 2022) وفي الوقت الحاضر، يُستخدم عدد من العوامل المضادة للبكتيريا الحديثة، مثل فلوريد القصدير وسترات الزنك، على نطاق واسع في تركيبات معاجين الأسنان، إذ لا يقتصر دورها على الحد من التسوس، بل تمتد فعاليتها إلى تقليل التهاب اللثة والتخفيف من رائحة الفم الكريهة عبر تقليل الحمل البكتيري داخل التجويف الفموي.(Murugesan *et al.*, 2025)

# الفصل الثالث

## 3. مواد وطرائق العمل

### 1.3 الأجهزة والأدوات المستخدمة

**يبين جدول (1) الأجهزة والأدوات التي استعملت في التجارب العلمية**

**الجدول (1) الأجهزة والأدوات التي استعملت في التجارب العلمية**

| ت | اسم الجهاز | الشركة المصنعة |
|---|---|---|
| 1 | مؤصدة Autoclave | (Korea) Daihan lab tech |
| 2 | Incubator حاضنة | ,(England) Gallenkam |
| 3 | Centrifuge جهاز نبذ مركزي | ,(England) Gallenkam |
| 4 | Light Microscope مجهر ضوئي | (Japan) Olympus |
| 5 | Sensitive Balance ميزان حساس | (Germany) Sartorious |
| 6 | Vortexمازج | (Germany) Julabo |
| 7 | Water bathحمام مائي | (Germany) Heidolph |
| 8 | Water distillerجهاز تقطير ماء | (USA) PistillerWsc |
| 9 | Eppendorf tubesانابيب دقيقه | (USA) Promega |
| 10 | فلاسكات حجميةErlenmeyer flask | (India) Jiassco |
| 11 | micropipetteماصات دقيقه | (Germany) Laboratory |
| 12 | PCR | |
| 13 | Bunsen burnerلهب | |

| | | |
|---|---|---|
| 14 | Sterile swabs مسحات معقمة | (China) WTC CN |
| 15 | Petri Dishطبق بتري | (USA)Fisher Scientific |
| 16 | slide &cover slideشرائح | MEHECO(china) |

**2.3 المضادات الحيوية Antibiotics**

**جدول (2) المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة المجهزة من شركةBioanalyse التركية (CLSI, 2022)**

| ت | اسم المضاد | الرمز | التركيز | الشركة والبلد المنشا |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Erythromycin | E | 15 | Bioanalyse |
| 2 | Cefotaxime | CTX | 10 | Bioanalyse |
| 3 | Ciprofloxacin | CIP | 10 | Bioanalyse |
| 4 | Cefixime | CFM | 5 | Bioanalyse |
| 5 | Azithromycin | AZM | 15 | Bioanalyse |
| 6 | Streptomycin | S | 25 | Bioanalyse |
| 7 | Amikacin | AK | 10 | Bioanalyse |
| 8 | Gentamycin | CN | 10 | Bioanalyse |
| 9 | Amoxicillin | AX | 10 | Bioanalyse |
| 10 | Imipenem | IPM | 10 | Bioanalyse |

### 3.3 البادئات Primers

**الجدول(3): البادئات المستخدمة في الدراسة**

| اسم الجين | تسلسل القواعد | Annealing | حجم الجين المستهدف bp |
|---|---|---|---|
| Lipase Production | | | |
| Lip1 | FAGCTCAGCAAATGCATCACA 20<br>R CGCTAAGCCACGTCCATATT 20 | 57م | 398 |
| B - lactamase Production | | | |
| blaZ | FAAAGAAATCGGTGGAATCAAAA 22<br>TCTTACCGAAAGCAGCAGGT 20 R | 57م | 148 |
| Methicillin Resistance | | | |
| mecA | AAAATGGAGCTTGGGAGTCA 20 F<br>R TCATCGAAACTTGGCAAATG 20 | 56م | 472 |
| Azithromycin Resistance | | | |
| Mph | FAAACGAACAAAACCCAAAA 20<br>R GTGGGTTGCTTCAGTCCAGT 20 | 57م | 501 |

### 4.3 معاجين الاسنان Toothpaste

**جدول(4) المعاجين المستخدمة في الدراسة والشركة المصنعة لها**

| ت | المعجون | الشركة المصنعة |
|---|---|---|
| 1 | Duabar Herb'l Miswak | Duabar |
| 2 | Crest Complete | Procter & Gamble (P&G) |
| 3 | Signal | Unilever |
| 4 | SensiKIN Gel | Laboratorios KIN |
| 5 | Sensodyne | GSK – Haleon |

## 2.3 طرائق العمل Methods

### 1.2.3 التعقيم Sterilization

استعملت العديد من وسائل التعقيم في هذه الدراسة. وبحسب ما يناسب المواد المراد تعقيمها وتم لتعقيم اعتماداً لما ورد في( Brown and Smith, 2017 ) وعلى النحو الاتي:

التعقيم الرطب بالمؤصدة Wet sterilization by Atoclave

عقمت جميع الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة وبعض المحاليل التي لا تتلف بالحرارة باستعمال جهاز التعقيم Autoclave بدرجة حرارة 121°م وتحت ضغط 15 باوند/ إنج2 ولمدة 15 دقيقة.

Dry Sterilization by Ovenالتعقيم الجاف بالفرن الحراري

استعمل الفرن Oven عند درجة حرارة 180°م لمدة 3 ساعات على الأقل لتعقيم الزجاجيات التي استعملت في هذه الدراسة.

التعقيم الجاف باللهب Dry Sterilization by Flam

تم استعمال مصباح بنزن في تعقيم عروة النقل Loop full قبل نقل البكتيريا من المزارع المختلفة كما واستعمل لتعقيم فوهات الدوارق وانابيب الاختبار.

التعقيم بالكيمياويات Sterilization by Chemicals

استعمل الايثانول بتركيز 70% لتعقيم اليدين، وأماكن الزرع، وأيضاً استعمل الايثانول المطلق لتعقيم الملقط المستعمل في فحص الحساسية.

### 2.2.3 جمع العينات:

تم جمع خمسة عشرة عيّنة من مرضى يراجعون عيادات الأسنان في مستشفى تكريت التعليمي. جرى أخذ المسحات من مواضع تسوّس الأسنان باستخدام مسحات قطنية معقمة، مع الحرص على الحفاظ على شروط التعقيم أثناء الجمع. نُقلت العينات فورًا إلى المختبر خلال مدة لم تتجاوز الساعة الواحدة، وذلك

لإجراء عمليات الزرع المخبري والفحوصات التشخيصية اللازمة ، وكانت خمسة عشر عينة موجبة وحصلنا منها على عزلات بكتيرية مختلفة.

-الزرع

تم نقل المسحات البكتيرية المأخوذة من الأسنان واللويحات السنية والجيوب اللثوية، وتم عزل الأنواع البكتيرية *Staphylococcus spp*. و *Pseudomonas spp* و *Streptococcus mutans*، ثم زُرعت جميع العينات على أوساط تشخيصية تم حضنت جميع الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة، وبعد ظهور النمو تم أخذ المستعمرات المفردة لغرض التنقية والتشخيص وفقًا لما ورد في (Boondireke *et al.*, 2025)

**3.2.3 الصفات الزرعية**

تمت دراسة الصفات الزرعية والمجهرية للبكتيريا

*Staphylococcus aureus*و *Pseudomonas aeruginosa*و *Streptococcus mutans*

باستخدام الأوساط الغذائية المناسبة لكل نوع.

*Staphylococcus aureu*

زرعت على وسطMannitol Salt Agar ، حيث تم ملاحظة شكل المستعمرات، حجمها، لونها، وحدودها،بالإضافة إلى قدرتها على تحويل المانيتول، ما يميزها عن البكتيريا الأخرى.

*Pseudomonas aeruginosa*

زرعت علىBlood Agar ، حيث لوحظ نمو واضح للمستعمرات، ولونها الأخضر المائل إلى الرمادي، مع بعض الظواهر التحللية الخاصة بهذا النوع.

*Streptococcus mutans*

زرعت على وسط يشبهMitis Salivarius Agar ، المائل إلى الأزرق، حيث أظهرت المستعمرات خصائص مميزة من حيث الشكل واللون والحجم.

بعد اكتمال نمو المستعمرات، أُخذت عينات باستخدام حملة لوبLoop full ، وُضعت على شريحة زجاجية مع قطرة ماء، وأُعدت منها مسحة Smear ثم صُبغت بصبغة كرام.

أظهرت الملاحظات المجهرية اختلاف ترتيب وأشكال الخلايا لكل نوع:

تجمع عنقودي في*Staphylococcus aureus*.

أشكال عصوية مميزة في*Pseudomonas aeruginosa*.

سلاسل من الخلايا في*Streptococcus mutans*.

### 4.2.3 الفحوصات المجهريةMicroscopic Examination

تم أخذ مسحات من المستعمرات البكتيرية النامية بعمر 24 ساعة، ووُضعت على شريحة زجاجية ثم تُركت لتجف. بعد ذلك، تم تثبيت البكتيريا بواسطة اللهب وصبغها باستخدام صبغة كرام. بعد الصبغ، تم فحص الشرائح تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية بقوة تكبير X100، حيث تم ملاحظة شكل الخلايا، ترتيبها، وقدرتها على التفاعل مع صبغة كرام (Levinson, 2016)

### 1.4.2.3 الاختبارات الكيموحيوية:

أجريت اختبارات كيميائية لغرض تشخيص البكتريا بعد 24 ساعة من نموها:

### 2.4.2.3اختبار إنزيم التجلطCoagulase Test

يُعد إنزيم التجلط من عوامل الضراوة في بكتيريا *Staphylococcus aureus*، ويعمل على تخثر بلازما الدم. يتم الفحص بطريقتين:

طريقة الشريحة: تتم بنقل مستعمرة بكتيرية إلى شريحة زجاجية معقمة وإضافة قطرة من البلازما ومزجها، وتُعد النتيجة موجبة عند ظهور تلازن خلال 15 ثانية وسالبة عند عدم ظهور تلازن (Tille, 2017).

طريقة الأنبوب:تتم بإضافة 0.5 مل من البلازما إلى أنبوب اختبار ثم إضافة 0.5 مل من المزرعة البكتيرية السائلة وحضنها عند 37°م لمدة 4 ساعات، وتُعد النتيجة موجبة عند تكوّن خثرة. وإذا لم تظهر خثرة تُحضن الأنابيب حتى 24 ساعة للتأكد من النتيجة (Macfaddin, 2000)

**3.4.2.3 اختبار الأوكسيديز Oxidase Test**

يُجرى اختبار الأوكسيديز من خلال نقل جزء من المستعمرة البكتيرية النقية بواسطة عود خشبي إلى ورقة ترشيح مرطبة بعدة قطرات من كاشف الأوكسيديز (Oxidase Reagent) . يُعد الاختبار موجباً عند ظهور لون بنفسجي خلال مدة تتراوح بين 10–30 ثانية، بينما يدل عدم حدوث أي تغير في اللون على أن النتيجة سالبة(Chess, 2019) .

**4.4.2.3 اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Growth on Mannitol Salt Medium Test (MSA Test)**

أُجري الاختبار للتمييز بين *Staphylococcus aureus* المخمرة للمانيتول والأنواع غير المخمرة. جرى أخذ مسحة من مستعمرة بكتيرية نقية وزرعها على وسط Mannitol Salt Agar ثم حضنت الأطباق عند 37°م لمدة 24 ساعة. يدل ظهور المستعمرة بلون أصفر ذهبي على تخمير المانيتول، بينما تظهر الأنواع غير المخمرة باللون الأبيض أو الوردي (Brook *et al*., 2007).

**5.4.2.3 اختبار الكاتاليز Catalase Test**

يُستخدم اختبار الكاتاليز للكشف عن إنتاج إنزيم Catalase القادر على تحليل H2O2 إلى ماء وأوكسجين. نُقلت العزلة البكتيرية إلى شريحة زجاجية نظيفة باستخدام عود خشبي ثم أضيفت قطرة من Hydrogen Peroxide (H2O2)، ويعد ظهور الفقاعات دليلاً على إيجابية الفحص (Chess, 2019).

**6.4.2.3 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test**

تم اختبار حساسية عشر أنواع من المضادات الحيوية ،وذلك اعتمادا على ما جاء في( Kirby *et*

*al.,*1990)

حضرت أطباق وصب فيها وسط مولر هنتون Mueller Hinton Agar المعقم وتركت إلى أن تصلبت.

حضرت المزارع البكتيرية بنقل مستعمرة مفردة إلى أنابيب حاوية عل 5 مل من وسط المرق المغذي ، ومن ثم حضنت في 37 مُ لمدة 24 ساعة.

خفف العالق البكتيري بالمحلول الفسلجي المعقم لكي يتم الحصول على عالق متجانس وقورنت عكورة النمو مع عكورة أنابيب ماكفر لاند.

نشر العالق البكتيري باستخدام مسحة قطنية معقمة غمست بالعالق البكتيري على وسط المولر هنتون، ومن ثم تركت الأطباق لمدة 5 دقائق.

ثبتت أقراص المضادات الحيوية باستخدام ملقط معقم عل الطبق بواقع 5 أقراص للطبق الواحد مع ترك مسافة بين قرص وآخر لكي يتم تجنب التداخل بين مناطق التثبيط، ثم حضنت الاطباق لمدة24 ساعة و بدرجة 37 مُ.

سجلت النتائج عن طريق قياس أقطار التثبيط باستخدام وحدة المليمتر حول كل قرص ثم فسرت وفقا لما .( Kirby *et al.,* 1996)

**3.3 تحضير التخافيف Dilution Preparation لمعاجين الأسنان**

تمت عملية تحضير التخافيف بهدف تحديد تأثير تركيز معاجين الأسنان المختلفة على نمو العزلات البكتيرية.

أُجريت سلسلة تخافيف تدريجية (60% 80% 100%)، بحيث يمثل كل تخفيف معاملة مستقلة Treatmentيتم مقارنتها مع مجموعة السيطرة.Control حيث سمح باتباع هذه الطريقة بدراسة العلاقة بين التركيز والفعالية، وحدد أقل تركيز قادر على إحداث تثبيط ملحوظ لنمو البكتيريا ( Minimum Inhibitory Concentration-like Effect)(Bedre *et al*., 2018)

### 4.3 التحري عن مدى الحساسية لمنتجات معاجين الأسنانSusceptibility Testing

تم تقييم الفعالية المضادة للميكروبات لمعاجين الأسنان باستخدام طريقة الانتشار على الآغارAgar) (Diffusion Method ، المشابهة لاختبار Kirby–Bauer القياسي.

تم إجراء إعادة زراعة البكتريا Fresh Culture Preparation للحصول على طبقة بكتيرية نشطة ومتجانسة على الوسط الزرعي.

ثم زرعت العزلات البكتيرية على سطح أطباق مولر–هيلتون باستخدام المسحة القياسية Lawn culture للحصول على طبقة نمو متجانسة.

استخدم مثقاب آغار معقم Cork borer لعمل حفر دائرية في الوسط بقطر ثابت يتراوح بين 6–8 مم، مع إزالة قطع الآغار بحذر لضمان انتظام الحفر.

ملأت كل حفرة بكمية معيارية مقدارها 50 µL من معجون الأسنان من تحضيراته المخففة (60%، 80%، 100%) باستخدام ماصة معقمة لضمان حجم ثابت لكل معاملة.

تُركت الأطباق لمدة 20–30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة للسماح بانتشار العوامل الفعالة داخل الوسط قبل الحضانة.

حُضنت الأطباق تحت الظروف الملائمة لنمو كل عزلة بكتيرية.

بعد انتهاء فترة الحضانة، قيست أقطار مناطق التثبيط (Inhibition Zones) حول الحفر باستخدام مسطرة معقمة أو كاليبر رقمي، وسُجلت النتائج بالمليمتر(Li *et al*., 2025) .

### 5.3استخلاص الدنا من البكتيريا Extraction DNA from Bacteria

تم نقل مستعمرات من العزلات البكتيرية إلى 10 مل من وسط المرق المغذي وحضنت لمدة 24 ساعة عند 37م.

وضع (1.5) مل من العالق البكتيري في انبوبة ابندروف Micro centrifuge tube المعقمة وذلك بإستعمال ماصة دقيقةMicropipette ، بعدها وضعت الانبوبة في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بمعدل 14000 دورة/ دقيقة وذلك لترسيب البكتيريا وإهمال الوسط السائي

وضع 500 مايكروليتر من محلول Lysis buffer داخل الانبوبة التي تحتوي على البكتيريا المترسبة ومُزج جيداً بالماصة.

ببعدها وضعت الانبوبة الحاوية على البكتيريا والمحلول في الحمام المائي Water bath لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 5°م، وبعدها تم إخراج الأنبوبة من الحمام المائي وتركت لتبرد.

أضيف 500 مايكروليتر من محلول washing buffer 1مع المزج جيداً، ثم وُضعت في جهاز الطرد المركزي المبرد لمدة دقيقه بمعدل 14000 دورة/دقيقة

تم اضفنا محلول washing buffer2 مع المزج جيداً، ثم وُضعت في جهاز الطرد المركزي المبرد لمدة دقيقه بمعدل 14000 دورة/دقيقة

عند انتهاء الوقت واستخراج الانبوبة من الجهاز نلاحظ تكون ثلاث طبقات نسحب الطبقة العليا الصافية والحاوية على DNA البكتيريا ونضعها في انبوبة ابندروف جديدة معقمة.

نضيف ضعف الحجم من كحول الايزوبروبانول، ثم نُوضع الانبوبة في التجميد لمدة 5 دقائق ثم توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بمعدل 14000 دورة/دقيقة لغرض ترسيب الدنا.

إهمال الجزء الطافي (الايزوبروبانول) وإبقاء الجزء المترسب DNA) الخلية البكتيرية. أضيف 500 مايكروليتر من (الايثانول 70%) لتخليص DNA من بقايا الايزوبروبانول بعدها وُضعت الانبوبة في جهاز

الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بمعدل 14000 دورة/دقيقة، بعد ذلك اهملنا لجزء العلوي (الايثانول70%) واحتفظنا بالجزء المترسب DNA الخلية البكتيرية.

أضيف 100 مايكروليتر من الماء المقطر على الانبوبة التي تحتوي على الدنا البكتيري وتُرك لمدة يوم واحد لغرض ضمان ذوبان الحامض النووي.(DNA)

وُضعت الانبوبة الحاوية على DNA الخلية البكتيرية في التجميد بدرجة حرارة 20−°م لحين الاستعمال (Chen and Kuo, 1993).

**جدول (5): البادئات المستخدمة في الدراسة**

| حجم الجين المستهدف bp | Annealing | تسلسل القواعد | اسم الجين |
|---|---|---|---|
| Lipase Production | | | |
| 398 | 57م | FAGCTCAGCAAATGCATCACA 20<br>R CGCTAAGCCACGTCCATATT 20 | Lip1 |
| B - lactamase Production | | | |
| 148 | 57م | FAAAGAAATCGGTGGAATCAAAA 22<br>TCTTACCGAAAGCAGCAGGT 20 R | blaZ |
| Methicillin Resistance | | | |
| 472 | 56م | AAAATGGAGCTTGGGAGTCA F 20<br>R TCATCGAAACTTGGCAAATG 20 | mecA |
| Azithromycin Resistance | | | |
| 501 | 57م | FAAACGAACAAAACCCAAAA 20<br>R GTGGGTTGCTTCAGTCCAGT 20 | Mph |

وضعت انابيب الابندروف الخاصة بهذه التفاعلات الحاوية على محلول التفاعل Premix فوق رك ثلجي لبقاء على درجة الحرارة المثلى اللازمة للحفاظ على مكونات الخليط.

أضيف 0.5 ML من كل بادئ من البادئات جدول (5) لكل انبوب ابندروف بتركيز 10 بيكو مول.

أضيف 3 MLمن DNA القالب الى الخليط.

أضيف 10 MLمن الماء المقطر المعقم لكل انبوب تم مزج الخليط جيداً باستعمال الماصة الدقيقة ونقلت الانابيب الى جهاز النبذ المركزي

تم وضع الانابيب في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler واجري التفاعل وذلك بضبط الجهاز حسب لبرنامج المخصص للتفاعل

بعد انتهاء وقت البرنامج رفعت العينات من جهاز المبلمر الحراري ونقلت لعمل الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% لمدة 60 دقيقة بمقدار 5.V/cm

سحب 4 mlمن انبوب ابندروف الواحد ووضع داخل الحفرة الموجودة في الهلام وهكذا بقية انابيب بندروف الحاوية على مزيج التفاعل وتم وضع 5 mlمن المؤشر marker في أحد الحفر ورحلت بعد ربط مجهز القدرة وضبط التيار والفولتية والوقت.

بعد اكتمال عملية الترحيل وضع هلام الاكاروز برفق ووضع داخل جهاز التصوير المزود بالاشعة فوق البنفسجية لملاحظة حزم DNA المتكونة مع احجامها الجزينية (Sambrook and Russel,2001) .

(Wegand *et al*.,1993)

## الفصل الرابع

### 4. النتائج والمناقشة

### 1.4 التشخيص Identification

شُخصت العزلات مبدئياً إعتماداً على التشخيص المجهري من خلال التصبيغ بصبغة كرامGrams لملاحظة استجابة الخلايا للصبغة واشكالها واحجامها وتجمعاتها:

#### 1.1.4 الفحص المجهري *Staphylococcus aureus*

أظهرت نتائج الفحص المجهري لبكتريا *Staphylococcus aureus*بعد صبغة غرام وجود خلايا كروية الشكلCocci موجبة لصبغة غرام، ذات لون بنفسجي داكن، مرتبة غالباً على شكل عناقيد عنقودية تشبه عناقيد العنب .Grape-like clusters كما تميّزت هذه البكتريا بعدم وجود الأسواط، وظهرت الخلايا بأحجام متقاربة، مما يؤكد الطبيعة غير المتحركة وغير المغلفة لمعظم العزلات(Ryan & Ray, 2022) .

#### 2.1.4 الفحص المجهري *Pseudomonas aeruginosa*

"أظهر الفحص المجهري لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*بعد صبغة غرام خلايا عصوية الشكل Rod-shapedسالبة لصبغة غرام، ظهرت باللون الوردي، وتميزت بوجود أسواط طرفية تمنحها قدرة واضحة على الحركة. كما بدت الخلايا مفردة أو على شكل أزواج دون تكوين سلاسل، وهو ما يتوافق مع الخصائص المورفولوجية المعروفة لهذا النوع(Janda & Messenger, 2021)

#### 3.1.4 الفحص المجهري – *Streptococcus mutans*:

بيّن الفحص المجهري لبكتريا *Streptococcus mutans*بعد إجراء صبغة غرام أنها بكتريا كروية الشكل Cocci موجبة لصبغة غرام، ظهرت باللون البنفسجي، ومرتبة عادة على شكل سلاسل قصيرة أو أزواج، وهو النمط المميز لبكتريا المكورات السبحية. كما تميّزت بصغر حجم الخلايا وعدم امتلاكها أسواط، مما يدل على طبيعتها غير المتحركة(Arana *et al*., 2023)

#### 4.1.4 الفحص الكيموحيوي:

خضعت جميع العزلات للتشخيص الكيموحيوي كما في الجداول (6)، وتم الاعتماد على تفسير نتائج التشخيص بمقارنتها مع(Jorgensen and Brown, 2015)

**جدول (6) نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية**

| *S. mutans* | *P. aeruginosa* | *S. aureus* | الاختبارات |
|---|---|---|---|
| + | – | cocci + | Gram stain |
| – | + | + | Catalase |
| – | + | – | Oxidase |
| – | – | + | Coagulase |
| + | – | + | Sugar fermentation |

اظهرت بكتريا *Staphylococcus aureus* نتائج مميزة في الاختبارات التشخيصية، إذ كانت موجبة لغرام، موجبة لاختبار الكاتاليز والتخثر، وسالبة للأوكسيديز(صوره1). بينما ظهرت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كعصيات سالبة الغرام، موجبة للكاتاليز والأوكسيديز، وغير قادرة على تخمير السكريات. أما *Streptococcus mutans* فقد تميزت بكونها كروية موجبة لغرام، سالبة للكاتاليز والأوكسيديز، وقادرة على تخمير السكريات، مما يساعد في التمييز الدقيق بين الأنواع الثلاثة.

توافق النتائج التشخيصية مع الصفات المورفولوجية والكيموحيوية المعروفة لكل نوع بكتيري، إذ تُعد إيجابية صبغة غرام واختبار الكاتاليز والتخثر من الصفات المميزة لـ *Staphylococcus aureus*والتي تساعد في التفريق بينها وبين الأنواع الأخرى. كما أن ظهور *Pseudomonas aeruginosa*كعصيات سالبة الغرام موجبة للأوكسيديز يتماشى مع طبيعتها الهوائية واعتمادها على الأكسدة في إنتاج الطاقة. أما

*Streptococcus mutans*فإن سلبية اختبار الكاتاليز مع قدرتها على تخمير السكريات تُعد من الصفات الأساسية التي تميز جنسStreptococcus ، خاصة الأنواع المرتبطة بتسوس الأسنان. وتؤكد هذه النتائج دقة الاعتماد على الفحوصات المجهرية والكيموحيوية في التشخيص البكتيري(Ryan & Ray, 2022)

**صوره (1): نتيجة اختبار تخمر سكر المانيتول لبكتريا *Staph. aureus* و تحول الوسط للون الاصفر.**

**جدول (7 ) نتائج العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Antibiotic كنسب مئوية.**

| المضاد | الاستجابة | *S. aureus* العدد الكلي 8 | | *P. aeruginosa* العدد الكلي 5 | | *S. mutans* العدد الكلي 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | العدد | % | العدد | % | العدد | % |
| Erythromycine | R | 8 | 100% | 5 | 100 | 4 | 100 |
| | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cefotaxime CTX | R | 8 | 100 | 5 | 100 | 4 | 100 |
| | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 8 | R | Ciprofloxacin CIP |
| 50 | 2 | 100 | 5 | 0 | 0 | S | |
| 50 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 100 | 4 | 100 | 5 | 100 | 8 | R | Cefixime CFM |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 0 | 0 | 100 | 5 | 100 | 8 | R | Azithromycin AZM |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 100 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 100 | 4 | 0 | 0 | 60 | 3 | R | Streptomycin S |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 0 | 0 | 100 | 5 | 40 | 2 | I | |
| 50 | 2 | 0 | 0 | 80 | 4 | R | Imipenem IPM |
| 50 | 2 | 0 | 0 | 20 | 1 | S | |
| 0 | 0 | 100 | 5 | 0 | 0 | I | |
| 0 | 0 | 100 | 5 | 100 | 8 | R | Amoxicillin AX |
| 50 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 50 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 100 | 4 | 100 | 5 | 100 | 8 | R | Gentamycin CN |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |
| 100 | 4 | 100 | 5 | 100 | 8 | R | Amikacin AK |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | S | |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | I | |

**جدول (8) نتائج العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية Antibiotic**

| S. mutans | P. aeruginosa | S. aureus | Antibiotic |
|---|---|---|---|
| Resistant | Resistant | Resistant | Erythromycin |
| Resistant | Resistant | Resistant | Cefotaxime |
| Partially Sensitive | Sensitive | Resistant | Ciprofloxacin |
| Resistant | Resistant | Resistant | Cefixime |
| Intermediate | Resistant | Resistant | Azithromycin |
| Resistant | Intermediate | Resistant | Streptomycin |
| Partially Sensitive | Intermediate | Resistant | Imipenem |
| Partially Sensitive | Resistant | Resistant | Amoxicillin |
| Resistant | Resistant | Resistant | Gentamycin |
| Resistant | Resistant | Resistant | Amikacin |

من الجدولين (7و8) تم تقييم استجابة كل مضاد وفق التصنيفات العالمية الحساسة(S) ، المتوسطة(I) ، والمقاومة (R) بناءً على المعايير المعتمدة من المنظمة العالمية.CLSI

أظهرت نتائج Erythromycin مقاومة كاملة لجميع العينات الثلاثة، مما يدل على أن هذا المضاد غير فعال ضد هذه البكتيريا ضمن العينات المدروسة.

وبالمثل، أظهرت Cefotaxime و Cefiximeمقاومة كاملة على جميع العينات، ما يعكس محدودية فعالية هذه المضادات من فئة البيتا لاكتاميات ضد الأنواع الثلاثة في هذا الإعداد التجريبي.

أظهر Ciprofloxacin نتائج متباينة؛ إذ كانت جميع عينات *S. aureus* مقاومة، بينما أظهرت جميع عينات *P. aeruginosa* حساسية تامة، ما يدل على فعالية عالية لهذا المضاد ضد هذه البكتيريا. بالنسبة

لـ*S. mutans* ، أظهرت النتائج خليطًا من الحساسية والوسيطية، حيث كانت نصف العينات حساسة والنصف الآخر وسيطة، مما يعكس فعالية متوسطة لهذا المضاد على هذا النوع.

كان Azithromycin مقاومًا تمامًا على *S. aureus* و*P. aeruginosa*، بينما أظهرت عينات *S. mutans* استجابة وسيطة، ما يشير إلى إمكانية تأثير محدود دون فعالية سريرية كاملة.

أما *Streptomycin* ، فقد أظهر فعالية جزئية؛ إذ كانت 60% من عينات *S. aureus* مقاومة و40% وسيطة، وكانت جميع عينات *P. aeruginosa* متوسطة الحساسية، بينما أظهرت عينات *S. mutans* مقاومة كاملة، ما يعكس قدرة محدودة لهذا المضاد تعتمد على نوع البكتيريا.

أظهر Imipenem فعالية متفاوتة، إذ كانت عينات S. aureus مزيجًا من المقاومة والحساسية الجزئية، بينما أظهرت عينات P. aeruginosa حساسية متوسطة، و S. mutans مزيجًا من المقاومة والحساسية، ما يشير إلى أن هذا المضاد قد يكون فعالًا جزئيًا لبعض العينات لكنه ليس الخيار الأمثل لجميع البكتيريا المدروسة.

أظهرت Amoxicillin مقاومة كاملة على *S. aureus* و*P. aeruginosa*، بينما كانت عينات *S. mutans* خليطًا من الحساسية والوسيطية، ما يعكس فعالية محدودة.

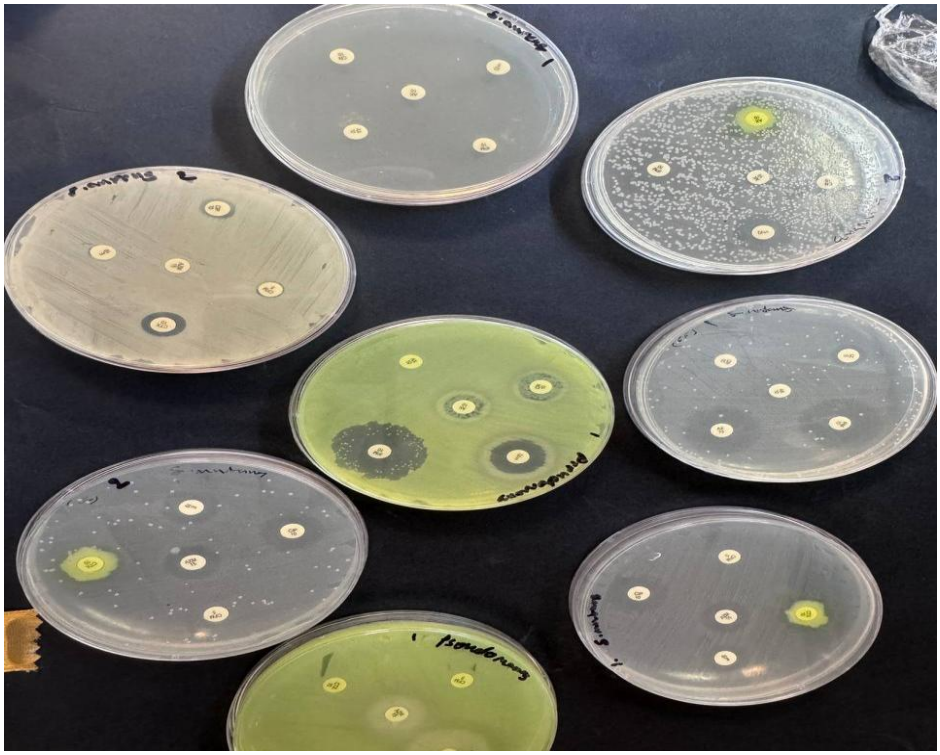
أظهرت كل من Gentamycin و Amikacin مقاومة كاملة لجميع العينات، مما يشير إلى عدم فعالية هذه المضادات ضمن هذه الدراسة.

نستنتج من ذلك أن المقاومة المرتفعة لمضادي Erythromycin و Azithromycin قد تعود إلى آليات مقاومة الماكروليدات مثل تعديل موقع ارتباط الدواء على الريبوسوم أو وجود مضخات إخراج تقلل من تركيزه داخل الخلية، إضافة إلى كثرة استعمال هذه المضادات في علاج التهابات الجهاز التنفسي والفموية، مما يؤدي إلى ضغط انتقائي يعزز ظهور السلالات المقاومة .(Levinson, 2016) أما المقاومة الكاملة لمضادات Cefotaxime و Cefixime و Amoxicillin فترتبط غالبًا بإنتاج إنزيمات البيتا–لاكتاماز التي

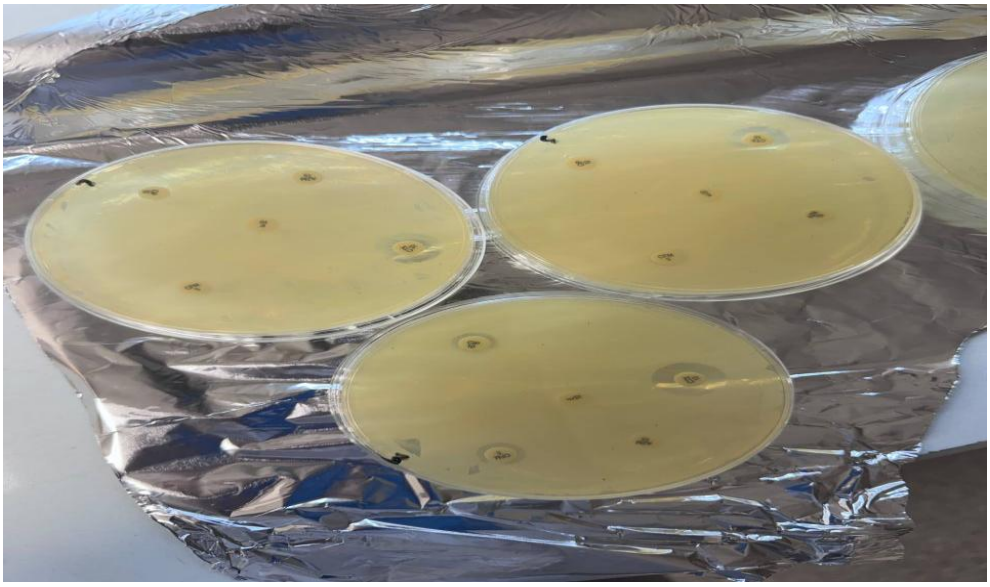
تقوم بتحليل الحلقة البيتا–لاكتامية وتعطيل فعالية الدواء، وهي آلية شائعة في البكتيريا موجبة وسالبة الغرام (Ryan & Ray, 2022).

كما أن التباين في نتائج Ciprofloxacin قد يعود إلى حدوث طفرات في إنزيمي DNA gyrase وTopoisomerase IV، وهما الهدفان الرئيسيان لهذا المضاد، مما يفسر اختلاف الحساسية بين الأنواع البكتيرية. أما مقاومة Streptomycin و Gentamycinو Amikacin فقد ترتبط بإنزيمات تعديل الأمينوغلايكوسيدات أو تقليل نفاذية الغشاء الخلوي، في حين أن الاستجابة المتباينة لمضاد Imipenem قد تعكس تغيرات في بروتينات الارتباط بالبنسلين أو انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي.

بشكل عام، تشير النتائج إلى أن كثرة الاستخدام العشوائي أو غير المنضبط للمضادات الحيوية تلعب دورًا رئيسيًا في ارتفاع نسب المقاومة بين العزلات المدروسة، مما يؤكد أهمية إجراء اختبار الحساسية قبل اختيار العلاج المناسب.



**صورة (2) نتائج اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية على وسط اكار مولر هنتون للعزلات قيد البحث**



**صورة (3) نتائج اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية على وسط اكار مولر هنتون البحث**

**جدول (9) نتائج فعالية معاجين الاسنان**

| *S. mutans* | *P. aeruginosa* | *S. aureus* | conc | toothpaste |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 40 | %100 | Crest |
| 0 | 0 | 19 | %80 | Crest |
| 0 | 0 | 15 | %60 | Crest |
| 0 | 0 | 0 | %100 | Sensodyne |
| 0 | 0 | 15 | %80 | Sensodyne |
| 0 | 0 | 0 | %60 | Sensodyne |
| 0 | 0 | 0 | %100 | Kin |
| 0 | 0 | 0 | %80 | Kin |
| 0 | 0 | 0 | %60 | Kin |
| 0 | 0 | 0 | %100 | Signal |
| 0 | 0 | 0 | %80 | Signal |
| 0 | 0 | 0 | %60 | Signal |
| 0 | 0 | 0 | %100 | Dabur |
| 0 | 0 | 0 | %80 | Dabur |
| 0 | 0 | 0 | %60 | Dabur |

أظهرت نتائج الدراسة تفاوت فعالية معاجين الأسنان الخمسة تجاه *S. aureus* حسب نوع المعجون والتركيز المستخدم، بينما لم تُظهر أي فعالية تجاه *P. aeruginosa* أو *Streptococcus mutans* في جميع التراكيز المختبرة جدول (9)

بالنسبة لـ*Staph. aureus* ، لوحظ أن معجون كرست أبدى أعلى نشاط مثبط عند تركيز 100%، حيث بلغت مساحة التثبيط 40 مم، مما يشير إلى احتواء المعجون على مكونات فعالة قادرة على اختراق الجدار الخلوي للبكتيريا موجبة الغرام. بينما أظهرت التراكيز الأقل (80% و60%) مناطق تثبيط أصغر بلغت 19 مم و15 مم على التوالي، وهو ما يدل على أن الفعالية المضادة للبكتيريا مرتبطة ارتباطًا مباشرًا بتركيز المادة الفعالة في المعجون.

أظهر معجون سنسوداين فعالية محدودة عند تركيز 80% فقط بمساحة تثبيط بلغت 15 مم، ولم يسجل أي تأثير عند التراكيز الأخرى. ويرجع ذلك إلى تركيبة المعجون المخصصة للأسنان الحساسة، والتي تحتوي على مواد ذات نشاط مضاد للبكتيريا أقل. أما معاجين كين وسكنال دابر فلم تُظهر أي نشاط مثبط في جميع التراكيز، مما يشير إلى أن تراكيز المواد الفعالة فيها غير كافية لإحداث تأثير أو أن المعجون يفتقر تمامًا إلى مكونات مضادة للبكتيريا.

اما بكتيريا*P. aeruginosa* ، لم تُظهر أي من المعاجين الخمسة أي نشاط مثبط على الإطلاق في جميع التراكيز. وهذه النتيجة تتوافق مع ما هو معروف عن مقاومة السيدوموناس العالية للعديد من المضادات والمواد الكيميائية، والتي تعود إلى الطبيعة الخاصة لغشائها الخارجي السميك، وجود مضخات إخراج فعالة، وقدرتها على تكوين طبقات حيويةBiofilm تحميها من التأثير المباشر للمواد المضادة للبكتيريا، مما يجعلها واحدة من أكثر البكتيريا مقاومة لمكونات معاجين الأسنان التجارية.

اما بكتيريا *Streptococcus mutans* فلم تُظهر جميع المعاجين أي نشاط مثبط في أي من التراكيز. ويُفسَّر ذلك بكون *S. mutans* بكتيريا محبة للحمض، تعيش في بيئات الفم منخفضة الحموضة، مما

يمنحها قدرة أكبر على مقاومة المواد الفعالة الموجودة في معاجين الأسنان، خصوصًا عند الاستخدام المباشر دون إضافة مواد مساعدة تعزز من نشاط المضاد الحيوي..

تشير النتائج إلى أن فعالية معاجين الأسنان تختلف باختلاف نوع المعجون وتركيز المادة الفعالة فيه، حيث أظهر معجون Crest أعلى نشاط تثبيطي ضد *Staphylococcus aureus* عند تركيز 100%، مما يدل على احتوائه على مركبات ذات قدرة على التأثير في الجدار الخلوي للبكتيريا موجبة الغرام. ويرتبط ذلك بحساسية البكتيريا موجبة الغرام نسبيًا لبعض المركبات الكيميائية مقارنة بالبكتيريا سالبة الغرام بسبب غياب الغشاء الخارجي الواقي. كما أن انخفاض مساحة التثبيط عند تقليل التركيز يؤكد وجود علاقة طردية بين تركيز المادة الفعالة وكفاءتها المضادة للبكتيريا(Mah & O'Toole, 2001) .

في المقابل، فإن عدم ظهور أي نشاط مثبط لمعاجين الأسنان ضد *Pseudomonas aeruginosa* يتفق مع ما هو معروف عن طبيعة هذه البكتيريا عالية المقاومة، إذ تمتلك غشاءً خارجيًا منخفض النفاذية، إضافة إلى مضخات إخراج فعالة وأنظمة دفاع متعددة، فضلًا عن قدرتها الكبيرة على تكوين الأغشية الحيوية (Biofilm) التي تقلل من تأثير المواد الكيميائية والمضادات الحيوية وتُعد هذه الخصائص من أهم العوامل التي تجعلها مقاومة لمعظم المركبات المستخدمة في المنتجات الفموية التجارية (Costerton *et al.*, 1999) .

أما بالنسبة لعدم تأثر *Streptococcus mutans* بجميع المعاجين المختبرة، فيمكن تفسير ذلك بقدرتها العالية على تكوين مصفوفة خارج خلوية غنية بالسكريات من خلال إنزيمات الغلوكوزيل ترانسفيراز، مما يعزز تكوين الغشاء الحيوي ويحمي الخلايا البكتيرية من العوامل المضادة للبكتيريا كما أن طبيعتها المحبة للحمض وقدرتها على العيش في بيئات منخفضة الرقم الهيدروجيني داخل الفم تمنحها ميزة إضافية في مقاومة المواد الفعالة الموجودة في معاجين الأسنان، خاصة في الظروف المختبرية التي تفتقر إلى العوامل المساعدة الموجودة في البيئة الفموية الطبيعية(Bowen&Koo 2011)

وبناءً على ذلك، يتضح أن معاجين الأسنان التجارية قد تُظهر فعالية جزئية ضد بعض الأنواع، إلا أن تأثيرها محدود تجاه البكتيريا ذات القدرة العالية على تكوين الأغشية الحيوية، مما يؤكد أن دورها وقائي ومساند ولا يُغني عن الإجراءات العلاجية أو الوقائية الأخرى.

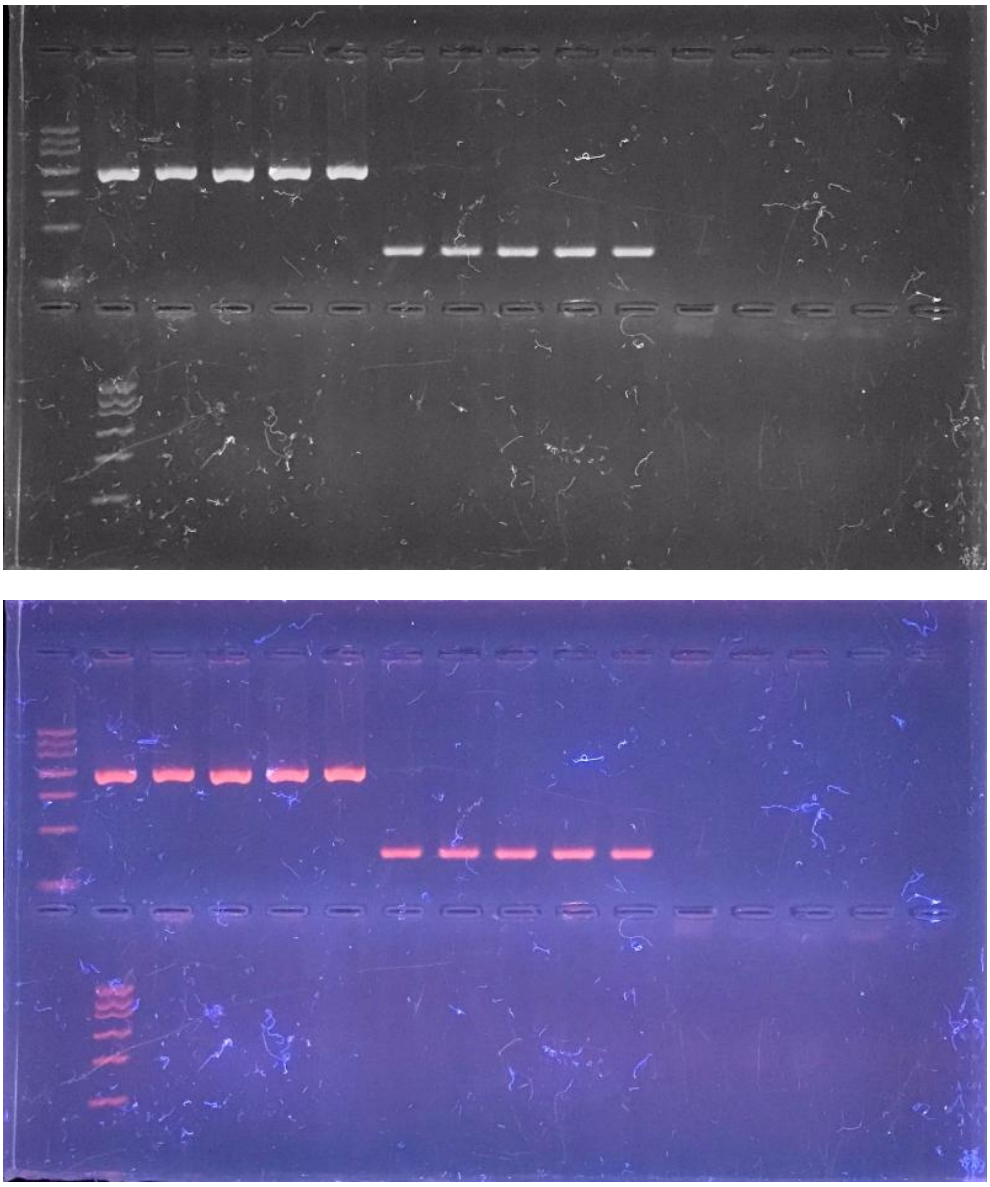
وعند المقارنة بين تأثير المضادات الحيوية ومعاجين الأسنان على العزلات البكتيرية، أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ارتفاع نسب المقاومة في العزلات البكتيرية الثلاث (*Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Streptococcus mutans*)، حيث سُجلت مقاومة كاملة (100%) لعدد من المضادات المختبرة، مما يعكس محدودية فعاليتها ضمن الظروف المختبرية لهذه الدراسة. وتشير هذه النتائج إلى انتشار آليات مقاومة دوائية تقلل من كفاءة العديد من المضادات الحيوية المستخدمة شائعًا في معالجة العدوى الفموية.

في المقابل، أظهرت معاجين الأسنان المختبرة تأثيرًا تثبيطيًا انتقائيًا، إذ سجل معجون Crestأعلى نشاط مثبط ضد *Staphylococcus aureus*بقطر تثبيط بلغ (40 مم) عند تركيز 100%، مع انخفاض واضح في الفعالية عند التراكيز الأقل، مما يدل على ارتباط النشاط المضاد للبكتيريا بتركيز المادة الفعالة. في حين لم تُظهر أي من المعاجين المختبرة تأثيرًا يُذكر ضد *Pseudomonas aeruginosa*أو *Streptococcus mutans*في جميع التراكيز المدروسة.

وعليه، يتبين أن فعالية المضادات الحيوية كانت محدودة نتيجة ارتفاع معدلات المقاومة، بينما أظهرت بعض معاجين الأسنان قدرة تثبيطية موضعية تجاه نوع معين من البكتيريا، إلا أن هذا التأثير يظل وقائيًا أو مساعدًا ولا يمكن اعتباره بديلاً عن العلاج الدوائي الموجّه عند وجود عدوى بكتيرية فعلية تتطلب تدخلاً علاجياً متخصصاً.

**صورة (4) نتائج اختبار معاجين الاسنان على وسط اكار مولر هنتون**

## 2.4 نتائج التحليل الجزيئي للجينات باستخدام تقنيةPCR



**صورة (5) نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج PCR للعينات قيد الدراسة**

الصورة (5) تظهر ان حجم القطعة الجينية لخمسة عينات يختلف عن حجمها لخمسة عينات الأخرى وهذا قد يشير إلى أن كل مجموعة تعود لجين مختلف أو لاليل مختلف لنفس الجين

أظهرت نتائج الفحص الجزيئي أن جيني Lip و blaZ كانا موجودين، في حين لم يكشف عن وجود جيني mecA و mph وبذلك يستدل على بقاء جيني Lip و blaZ واختفاء جيني mecA و mph

يمكن تفسير اختفاء بعض الجينات التي لم يكشف عن وجودها قد تم تثبيطها بفعل المعاجين، إذ أدى ذلك إلى إيقاف التعبير الجيني لها وتعطيل نشاط الأوبرون المسؤول عن تنظيمها. او بتأثير التعرض لمضاد حيوي معين، أو باختفاء الضغط الانتقائي لمضاد حيوي آخر، إضافة إلى التأثيرات المناعية للعائل، وكذلك بتنظيم التعبير الجيني الذاتي (gene regulation) الذي قد يؤدي إلى تثبيط أو تفعيل تعبير الجينات دون فقدانها فعليًا

يعزى بقاء بعض الجينات بسبب عدم تثبيطها وظيفيا، مما يدل على ترسّخ صفة المقاومة، وقد يكون ذلك نتيجة اندماجها ضمن جينات الصيانة الخلوية (housekeeping genes) واستمرار تعبيرها. كما يمكن أن يعود السبب إلى حدوث طفرات جينية ناتجة عن التعرض المتكرر لنفس المضاد الحيوي لفترات طويلة، أو إلى كبر حجم الجين المعبر عنه، الأمر الذي يصعب فقدانه ويؤدي إلى استمرارية وجوده ونشاطه داخل الخلية البكتيرية( Davies & Davies, 2010 )

# الفصل الخامس

## 5.الاستنتاجات والتوصيات conclusions and recommendation

### 1.5 الاستنتاجات conclusions

**من خلال دراستنا الحالية نستنتج مايلي :**

1. أثبتت الدراسة أن *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus mutans* و *Pseudomonas aeruginosa* تعد من البكتيريا الشائعة المرتبطة تسوس الاسنان والتهابات الاسنان.

2. أظهرت العزلات البكتيرية تباينا واضحا في خصائصها المظهرية والكيموحيوية، ما يؤكد ضرورة الاعتماد على أكثر من اختبار تشخيصي لضمان الدقة.

3. بينت نتائج اختبار الحساسية وجود مقاومة ملحوظة لعدد من المضادات الحيوية، خاصة بعض مضادات البيتا–لاكتام والماكروليدات والأمينوغلايكوسيدات، مما يعكس تصاعد مشكلة المقاومة الدوائية في تسوس الاسنان والتهابات الاسنان.

4. كشف التحليل الجزيئي (PCR) عن وجود جينات مرتبطة بالضراوة ومقاومة المضادات الحيوية مثل mecA و blaZ و mph في بعض العزلات، ما يفسر السلوك المقاوم الذي ظهر في الاختبارات الدوائية.

5. أظهرت معاجين الأسنان المختبرة تأثيرًا تثبيطيا متفاوتا على نمو البكتيريا، حيث كانت بعض الأنواع أكثر فعالية من غيرها، ويرتبط ذلك بتركيز ونوع المواد الفعالة الداخلة في تركيبها.

## 2.5 التوصيات recommendation

1. ضرورة إجراء اختبارات الحساسية الدوائية قبل وصف المضادات الحيوية في حالات تسوس الاسنان للحد من تفاقم المقاومة البكتيرية.
2. ارشاد استخدام المضادات الحيوية في الممارسات السريرية والابتعاد عن الوصف العشوائي.
3. تشجيع استخدام معاجين أسنان ذات فعالية مثبتة مخبريًا ضد بكتريا الفم، خصوصا لدى الأشخاص الأكثر عرضة للتسوس وأمراض اللثة.
4. التوسع في الدراسات الجزيئية لرصد جينات المقاومة والضراوة ومتابعة انتشارها.
5. إجراء دراسات مستقبلية على عينات أكبر وعدد أوسع من العلامات الجينية لزيادة دقة النتائج.
6. تعزيز برامج التوعية الصحية حول أهمية المحافظة على صحة الفم والأسنان من خلال الممارسات الوقائية المنتظمة كخط دفاع أول قبل اللجوء للعلاج الدوائي.

**References** **المصادر**

**Arana, M. J., et al. (2023).** *Oral microbiology and immunology* (2nd ed.). Wiley. Barbosa C, Sabino C, Alves M, et al. Oral biofilms: conceptual and practical implications for caries management. *J Dent Res.* 2020;99(10):1130–1138.

**Barbosa C, Sabino C, Alves M, et al (2020).** Oral biofilms: conceptual and practical implications for caries management. *J Dent Res.*;99(10):1130–1138. doi:10.1177/0022034520918305

**Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology, 45*(4), 493–496.

**Bedre, A. S., Arjunkumar, R., & Muralidharan, N. P. (2018).** *Evaluation of concentration dependent antimicrobial efficacy of herbal and non-herbal dentifrices against salivary microflora – An in vitro study*. *Biomedical and Pharmacology Journal, 11*(2), 711–718. https://doi.org/10.13005/bpj/1424

**Boondireke, S., Kitrueangphatchara, O., Sukajintanakarn, C., & Chiaraputt, S. (2025).** *Antibacterial effects of bioactive restorative dental materials on Streptococcus mutans: An in vitro study using the direct contact test*. *Saudi Dental Journal, 37*, Article 64. https://doi.org/10.1007/s44445-025-00073-4 (Springer Nature)

**Brooks, G. F., Butel, J. S., Carroll, K. C., & Morse, S. A. (2007).** *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (24th ed.). McGraw-Hill.

**Brown, A. E., Smith, H. A. (2017).** Benson´ s. Microbiological

**Chen, W. P., & Kuo, T. T. (1993).** A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research, 21*(9), 2260. https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260

**Cheng, L., Zhang, L., Yue, L., Ling, J., Fan, M., et al. (2022).** Expert consensus on dental caries management. *International Journal of Oral Science, 14*(1), 17. https://doi.org/10.1038/s41368-022-00167-3

**Chess, B. (2019).** *Medical immunology* (10th ed.). McGraw-Hill Education.

**Chmielewski, M., Załachowska, O., Komandera, D., Albert, A., Wierzbowska, M., Kwapisz, E., Katkowska, M., Gębska, A., & Garbacz, K. (2024).** The Oral Cavity—Another Reservoir of Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus*? *Antibiotics*, *13*(7), 649. https://doi.org/10.3390/antibiotics13070649

**Petriev, I., Pushankina, P., Shostak, N., & Baryshev, M. (2022).** Gas-Transport Characteristics of PdCu–Nb–PdCu Membranes Modified with Nanostructured Palladium Coating. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1), 228. https://doi.org/10.3390/ijms23010228

**Di Stefano, M., Polizzi, A., Santonocito, S., Romano, A., Lombardi, T., & Isola, G. (2022).** Impact of oral microbiome in periodontal health and periodontitis: a critical review on prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*, *23*(9), 5142.

**Fang, Y., Chen, X., Chu, C. H., Yu, O. Y., He, J., & Li, M. (2024).** Roles of *Streptococcus mutans* in human health: Beyond dental caries. *Frontiers in Microbiology, 15*, 1503657. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1503657

**Ganss, C., Schulze, K., & Schlueter, N. (2022).** Dental erosion and enamel demineralization: Mechanisms and preventive strategies. *Caries Research, 56*(3), 201–210. https://doi.org/10.1159/000521123

**Janda, J. M., & Messenger, S. (2021).** *Principles of bacteriology*. ASM Press.

**Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., & Ferretti, J. J. (2002).** Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99*(22), 14434–14439. https://doi.org/10.1073/pnas.172501299

**Jorgensen, J. H., & Pfaller, M. A. (2015).** *Manual of clinical microbiology* (11th ed.). ASM Press.

**Kanouté, A., Dieng, S. N., Diop, M., Dieng, A., Sene, A. K., Diouf, M., ... & Carrouel, F. (2022).** Chemical vs. natural toothpaste: which formulas for which properties? A scoping review. *Journal of Public Health in Africa*, *13*(3), 1945.

**Marsh, P. D. (2006).** Dental plaque as a biofilm and a microbial community: Implications for health and disease. *Caries Research, 40*(6), 469–480. https://doi.org/10.1159/000094280

**Pintado-Palomino, K., Cavalla, F., Giudicessi, C., et al. (2022).** The ecological plaque hypothesis and dental caries: Current evidence. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(1), 228. https://doi.org/10.3390/ijms23010228

**Krell, T. (2024).** *Pseudomonas aeruginosa: an overview of its biology, ecology, and clinical relevance*. *Trends in Microbiology*. https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.03.024 (Cell).

**Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019).** The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum, 7*(1), GPP3-0051-2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018

**Levinson, W. (2016).** *Review of medical microbiology and immunology* (14th ed.). McGraw-Hill Education.

**Li et al. (2025)** applied machine learning models to predict antimicrobial resistance patterns and compared their performance.

**MacFaddin, J. F. (2000).** *Biochemical tests for identification of medical bacteria* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

**Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A., & Nyvad, B. (2020).** Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by ORCA

and the Cariology Research Group of IADR. *Caries Research, 54*(1), 7–14. https://doi.org/10.1159/000503309

**Marsh, P. D. (2006).** Dental plaque as a biofilm and a microbial community: Implications for health and disease. *Caries Research, 40*(6), 469–480. https://doi.org/10.1159/000094280

**Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2

**Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318

**Bowen, W. H., & Koo, H. (2011).** Biology of Streptococcus mutans–derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*, 45(1), 69–86. https://doi.org/10.1159/000324598

**Rosenbach, F. J. (1884).** *Mikro-organismen bei den Wund-Infektionskrankheiten des Menschen*. Wiesbaden, Germany: J. F. Bergmann.

**Maier, T. (2023).** Oral microbiome in health and disease: Maintaining a healthy, balanced ecosystem and reversing dysbiosis. *Microorganisms*, *11*(6), 1453.

**Mulic, A., Tveit, A. B., & Skaare, A. B. (2021).** Gastroesophageal reflux disease and dental erosion. *Monographs in Oral Science, 29*, 86–99. https://doi.org/10.1159/000514947

**Pintado-Palomino, K., Cavalla, F., Giudicessi, C., et al. (2022).** The ecological plaque hypothesis and dental caries: Current evidence. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(1), 228. https://doi.org/10.3390/ijms23010228

**Qi, C., Peng, X., Yuan, S., Zhang, M., Xu, X., & Cheng, X. (2022).** Evaluation of the antibacterial and anti-inflammatory effects of a natural product-containing toothpaste. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 827643.

**Murugesan, D., Subramanian, C. S., & Kailasam, V. (2025).** Effect of Probiotic Toothpaste on Enamel Mineralization and Streptococcus mutans Levels

in Cleft Orthodontic Patients—A Randomized Clinical Trial. *The Cleft Palate Craniofacial Journal*, 10556656241309444.

**Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2021).** Dental caries. Nature Reviews Disease Primers, 7(1), 59. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0

**Rezaei, T., Mehramouz, B., Gholizadeh, P., Yousefi, L., Ganbarov, K., Ghotaslou, R., Taghizadeh, S., & Samadi Kafil, H. (2023).** Factors associated with *Streptococcus mutans* pathogenicity in the oral cavity. *Biointerface Research in Applied Chemistry, 13*(4), 368. https://doi.org/10.33263/BRIAC134.368

**Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2022).** *Sherris medical microbiology* (8th ed.). McGraw-Hill Education.

**Salh, A. R., Risan, M. H., & Jasim, H. M. (2022).** Biochemical characteristics and antibiotics susceptibility of *Streptococcus mutans* isolates from dental caries in Baghdad city. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 10*(1), 32–43. https://doi.org/10.22034/ijabbr.2022.534492.1363

**Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schlueter, N., & Amaechi, B. T. (2023).** Erosive tooth wear: A multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. *Nature Reviews Disease Primers, 9*, 18. https://doi.org/10.1038/s41572-023-00408-4

**Tille, P. (2017)**. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (14th ed.). Elsevier

**Teja, P. H., Mittal, S., Verma, A., Gagain, M., Aneja, G., & Gyalson, C. (2023).** Effectiveness of probiotic toothpaste in reducing streptococcus mutans in plaque around orthodontic brackets. *IP Indian Journal of Orthodontics and Dentofacial Research*, *9*(1), 30-35.

**Levinson, W. (2016).** *Review of medical microbiology and immunology* (14th ed.). McGraw-Hill Education**.**

**Ryan, K. J., & Ray, C. G. (2022).** *Sherris medical microbiology* (8th ed.). McGraw-Hill Education**.**

**Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022).** *Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa biofilm: A review*. *Pathogens, 11*(3), 300. https://doi.org/10.3390/pathogens11030300

**Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022).** *Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa biofilm: A review*. *Pathogens, 11*(3), 300. https://doi.org/10.3390/pathogens11030300 (PubMed)

**Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008).** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols, 3*(2), 163–175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

**Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023).** *Pseudomonas aeruginosa: Infections, animal modeling, and therapeutics*. *Cells, 12*(1), 199. https://doi.org/10.3390/cells12010199 (PubMed)

**Yamazaki, Y., Ito, T., Tamai, M., Nakagawa, S., & Nakamura, Y. (2024).** *The role of Staphylococcus aureus quorum sensing in cutaneous and systemic infections*. *Inflammation and Regeneration, 44*, Article 9. https://doi.org/10.1186/s41232-024-00323-8 (Springer).

**Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., & Lin, J. (2022).** *Treatment of Pseudomonas aeruginosa infectious biofilms: Challenges and strategies*. *Frontiers in Microbiology, 13*, 955286. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955286 (PubMed)

**Barbosa, C., Sabino, C., Alves, M., et al. (2020).** Oral biofilms: Conceptual and practical implications for caries management. *Journal of Dental Research, 99*(10), 1130–1138. https://doi.org/10.1177/0022034520951296

**Parsaei, M. S., Aflatoonian, K., Esfahani, Z. H., Soltani, A. D., & Sabzevari, B. (2022).** Scanning Electron Microscope Analysis And Investigation Of Shear Bond Strength Of Two Types Of Two-Stage Orthodontic Adhesive With Fluoride To Human Tooth Enamel. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, *13*.

**Pintado-Palomino, K., Cavalla, F., Giudicessi, C., et al. (2022).** The ecological plaque hypothesis and dental caries: Current evidence. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(1), 228. **https://doi.org/10.3390/ijms23010228**

**Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2021).** Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers, 7*(1), 59. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0

**Davies, J., & Davies, D. (2010).** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10