

Effect of Isolated Specific Lytic Phage against Growth and Biofilm Inhibition of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Isolated from Decayed Dental Plaque

Zahra Rajabi^{1,2},
 MohammadReza Afradi^{3,2},
 Donya Alinejhad⁴,
 Yousef Erfani⁵

¹ PhD in Microbiology, Zoonoses Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ MSc in Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Medical Laboratory, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

(Received February 19, 2022 ; Accepted October 30, 2022)

Abstract

Background and purpose: Despite advances in oral health and dental industry, tooth decay remains one of the most common oral diseases. One of the new methods to combat dental plaque, which is the main cause of caries, is using specific lytic bacteriophage. This study aimed to investigate the effect of isolated specific lytic phage against growth and biofilm inhibition of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* isolated from decayed dental plaque samples.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, dental plaque samples were cultured in MSA-specific medium to isolate *S. mutans* and *S. sanguinis*. Suspicious isolates were examined by biochemical tests and finally confirmed molecularly by PCR. The ability to form biofilm was measured by crystal violet colorimetry on a microtiter plate. Lytic bacteriophage was isolated from urban raw sewage using double layer agar method and phage morphology was examined by TEM electron microscopy. The effect of lytic phage on the growth of *S. mutans* and *S. sanguinis* was measured by agar spot and well diffusion and its inhibition effect on biofilm was assayed by microtiter plate method.

Results: Out of 150 plaque samples, *S. mutans* and *S. sanguinis* strains were isolated from 65 (43.33%) and 40 (26.67%) samples, respectively. *S. mutans* isolates showed stronger biofilm formation (OD= 0.43). The results of TEM showed lytic bacteriophage belonging to *Siphoviridae* family with a good inhibitory effect on the growth of *S. mutans* and *S. sanguinis* that was able to inhibit biofilm formation up to 96%.

Conclusion: Due to the small size of the phage particles that can have good penetration power to enter the biofilm layers, it can be concluded that the phage has the ability to fight dental plaque.

Keywords: dental plaque, *S. mutans*, *S. sanguinis*, bacteriophage, biofilm

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (216): 76-87 (Persian).

Corresponding Author: Yousef Erfani - School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran. (E-mail: yerfani@tums.ac.ir)

بررسی اثر فاژ لیتیک اختصاصی جدا شده بر رشد و مهار تشکیل بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندان پوسیده

زهرا رجبی^{2,1}
محمد رضا افرادی^{2,3}
دنیا علی نژاد⁴
یوسف عرفانی⁵

چکیده

سابقه و هدف: با وجود پیشرفت در صنعت بهداشت دهان و دندان، مشکل پوسیدگی دندان به عنوان یکی از شایع ترین بیماری های دهان به قوت خود باقی است. یکی از روش های جدید مبارزه با پلاک دندان که عامل اصلی پوسیدگی است، استفاده از باکتریوفاژ لیتیک خاص است. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر فاژ لیتیک اختصاصی بر رشد و مهار بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندان پوسیده بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی - توصیفی نمونه های پلاک دندان جهت جداسازی *S. mutans* و *S. sanguinis* جمع آوری و کشت در محیط MSA صورت پذیرفت. جدایه های مشکوک با تست های بیوشیمیایی بررسی و در نهایت با PCR تایید شدند. توانایی تشکیل بیوفیلم با رنگ سنجی کریستال ویوله در پلیت میکروتیتر سنجیده شد. باکتریوفاژ لیتیک با روش double layer agar از فاضلاب خام شهری جداسازی و مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی TEM بررسی شد. اثر فاژ لیتیک بر رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* به روش لکه گذاری در آگار و انتشار در چاهک و بر مهار بیوفیلم سنجیده شد.

یافته ها: از 150 پلاک مورد بررسی، 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans* و 40 مورد (26/67 درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. جدایه های *S. mutans* ($OD=0/43$)، بیوفیلم قوی تری به نمایش گذاشتند. نتایج بررسی TEM، باکتریوفاژ لیتیک متعلق به خانواده Siphoviridae را نشان داد که اثر مهاری خوبی بر رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* داشت و تا 96 درصد قادر به مهار تشکیل بیوفیلم بود.

استنتاج: باتوجه به اندازه ریز ذرات فاژ که می توانند قدرت نفوذ خوبی برای ورود به لایه های بیوفیلم داشته باشند، می توان به توانایی فاژ به عنوان روشی برای مبارزه با پلاک دندان اشاره نمود.

واژه های کلیدی: پلاک دندان، *S. mutans*، *S. sanguinis*، باکتریوفاژ، بیوفیلم

مقدمه

پوسیدگی دندان یکی از شایع ترین بیماری های دهان و دندان است که تقریباً افراد با گروه های سنی مختلف را درگیر می کند. بار اقتصادی و هزینه های هنگفت درمانی، پوسیدگی را به یکی از معضله های اساسی تبدیل نموده است که به دنبال عدم درمان، از بین رفتن بخشی از دندان و یا حتی کل دندان رخ می دهد (1).

E-mail: yerfani@tums.ac.ir

مؤلف مسئول: یوسف عرفانی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پیراپزشکی

1. دکتری میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری های مشترک انسان و دام (زئونوز)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

2. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

3. کارشناس ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

4. استادیار، گروه دندانپزشکی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

5. دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1400/11/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/1/23 تاریخ تصویب: 1401/8/8

پوسیدگی دندانی یک بیماری مزمن و چندعاملی می باشد که به واسطه دمنرالیزاسیون دندان ایجاد می گردد. یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده پوسیدگی، بیوفیلم میکروبی است که توسط باکتریهای فلور موجود در دهان و دندان و قندهای رژیم خوراکی بر سطح مینای دندان شروع می شود. استرپتوکوک ویریدانس، یک گروه ناهمگن از استرپتوکوک های آلفا همولیتیک، بخشی از فلور طبیعی دهان است که معمولاً مسئول پوسیدگی دندان، پریکورونیت و هم چنین اندوکاردیت عفونی تحت حاد است (2).

استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) *S. mutans* برای اولین بار از آسیب پوسیدگی دندان در سال 1924 توسط Clarke جدا شد و به عنوان اولین و اصلی ترین شروع کننده ها و مستقر شونده ها در ایجاد بیوفیلم پلاک دندانی و شروع پوسیدگی شناخته می شوند و همراه با *Streptococcus sobrinus* نقش اساسی در پوسیدگی دارند. به غیر از گروه موتانس، استرپتوکوکوس سنگوئینیس (*Streptococcus sanguinis*) *S. sanguinis* از گروه *sanguinis* هم در تشکیل پلاک دندان و ایجاد پوسیدگی نقش بسیار مهمی دارند. این ارگانیسم ها قادرند از قندهای موجود در رژیم غذایی مانند سوکروز، فروکتوز و گلوکز استفاده و تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) نمایند. تولید مقادیر زیاد EPS، یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده تشکیل بیوفیلم می باشد، که به دنبال تشکیل بیوفیلم تولید اسید توسط باکتری های به دام افتاده داخل بیوفیلم جهت رقابت برای مواد غذایی، صورت گرفته و حل شدن هیدروکسی آپاتیت مینای دندان و ایجاد پوسیدگی را به همراه خواهد داشت (3). از آن جا که کشور ما ایران در زمره کشورهای است که خطر پوسیدگی زودرس در کودکان وجود دارد و هم چنین آمار پوسیدگی بالایی در آن وجود دارد، به کار بردن رویکردهای جدیدی که بتوان برای مقابله با پوسیدگی های دندانی از آن ها استفاده نمود ضروری به

نظر می رسد. درمان های آنتی بیوتیکی به دلیل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی زنگ خطری برای مبارزه با بیوفیلم به شمار می رود (4). فاژ درمانی روشی جایگزین برای حل این معضل و از بین بردن باکتری مورد نظر می باشد. فاژ درمانی به عنوان یکی از هفت روش برای دستیابی به یک رویکرد هماهنگ برای مقابله با تهدیدات مقاومت های ضد باکتریایی در یک گزارش توسط موسسه ملی آلرژی و بیماری های عفونی در سال 2014 ارائه شد. این نشان دهنده اهمیت فاژ درمانی به عنوان یک ابزار مستند برای مبارزه علیه باکتری مقاوم می باشد. با این وجود موفقیت فاژ درمانی وابسته به توانایی غلبه بر محدودیت های استفاده از آن ها به عنوان عامل درمانی می باشد (5).

در سال های 1915 و 1917 دو دانشمند به نام های Frederick Twort و Félix d'Hérelle در ضمن آزمایش های خود به طور اتفاقی به وجود این فاژها پی بردند. باکتریوفاژها (فاژها) ویروس هایی هستند که فقط باکتری را آلوده می کنند. تقریباً 50 برابر کوچک تر از باکتری هستند (200-20 نانومتر) و در همه جا حاضر می باشند (6). دو، چرخه زندگی لیتیک (lytic) و معتدل (temperate) را دارند که در شکل عملکرد با هم متفاوت می باشند و در حالت لیتیک می توان از آن ها به عنوان گزینه های درمانی بهره برد. فاژهای لیتیک برای ساختن ژنوم و پروتئین های ساختاری بلافاصله درون میزبان تکثیر می یابد و درون سلول میزبان ویروئین های جدید ساخته می شود. سرانجام فاژهای جدید با پاره کردن دیواره سلولی آزاد می گردند و سبب مرگ سلول میزبان (باکتری) می گردد (7). فاژها بدون این که بر روی فلور طبیعی اثر بگذارند سلول باکتری هدف را آلوده می کنند و به طور طبیعی با ریشه کن کردن سلول باکتری از بدن حذف می گردند (8). بیش تر فاژها نه تنها اختصاصی عمل می کنند بلکه اختصاصی سویه هم می باشند (9). زمانی که فاژها از راه درون عروقی تجویز شده اند سریعاً از سیستم گردش خون پاکسازی شده و به طور غالب در طحال و کبد ذخیره

سنجش غلظت مناسب DNA به دست آمده، از دستگاه نانودراپ Thermo استفاده گردید (12). برای تایید مولکولی جدایه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis*، پرایمرهای ژن *gtfD* و *gtfP* که اختصاصی *S. mutans* و *S. sanguinis* بودند از مقاله معتبر، انتخاب و جهت ساخت به شرکت پویاگستر برای ارسال به آلمان فرستاده شد. ویژگی پرایمرهای مورد مطالعه در جدول شماره 1 آورده شده است.

جدول شماره 1: ویژگی پرایمرهای مورد مطالعه

دفعه	PCR Product (bp)	Primer Sequence (5'-3')	Target Gene
12	431	F: GGCACCACAACATTTGGGAAGCTCAGTT- R: GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT-	<i>gtfD</i>
2	313	F: GGATAGTGGCTCAGGCAGCCAGTT- R: GAACAGTTGCTGGACTTGTCTGTC-	<i>gtfP</i>

مراحل در دستگاه ترموسایکلر PeQlab مدل peQSTAR انجام پذیرفت و ردیابی محصول PCR با توجه به اندازه ژن‌ها با الکتروفورز بر روی آگارز 1 درصد و با بافر TBE 0/5 X، با ولتاژ 103 ولت و زمان حدود 37 دقیقه صورت پذیرفت. در پایان توسط دستگاه ژل داک، تصویر ژل تهیه شد. جهت بهینه نمودن شرایط PCR در حجم 20 میکرولیتر انجام پذیرفت.

بررسی تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندان

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم از روش کار جعفری و همکاران در سال 2015 استفاده شد. به طور خلاصه در پلیت 96 خانه پلی استیرن ابتدا 200 میکرولیتر از TSB به همراه سوکروز 2 درصد که حاوی کدورت نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) از باکتری مورد نظر به صورت جداگانه بودند به چاهک‌ها تلقیح و به مدت 48 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در مراحل بعد پس از شست و شوی پلیت‌ها برای تثبیت بیوفیلم باکتری از اتانول 96 درصد به میزان 200 میکرولیتر و در مرحله رنگ آمیزی از رنگ کریستال ویوله 1 درصد و در آخر اسید استیک گلاسیال استفاده

شده است. بیش تر شواهد پیشنهاد می‌دهد که پروتئین‌های سر باکتریوفاژها با گیرنده‌های مشخصی بر روی سلول‌های ایمنی واکنش داده و سبب تولید سایتوکاین‌ها و پاسخ ایمنی هومورال می‌شود و تا زمانی که فاژ پاکسازی نشود پاسخ ایمنی سلولی هم وارد عمل می‌شود (10). فاژها به دلیل اندازه شان می‌توانند قدرت نفوذ خیلی خوب و موثری را به درون بافت بیوفیلم داشته باشند، بنابراین به منظور رویکرد مقابله با پلاک دندان، هدف از این مطالعه بررسی اثر باکتریوفاژ لیتیک اختصاصی بر تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans* و *S. sanguinis* بود.

مواد و روش‌ها

جدا سازی، شناسایی اولیه و تایید مولکولی *S. mutans* / *S. sanguinis* از پلاک دندان

در این مطالعه مقطعی - توصیفی نمونه‌های پلاک دندان، توسط دندانپزشک از پلاک دندان‌های پوسیده مراجعه کنندگان به درمانگاه دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (امیرآباد) گرفته و در (PBS: Phosphate Buffer Salin) - (مرک - آلمان) با شرایط مناسب سرمایی به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور دسترسی به کلونی‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* کشت بر روی محیط اختصاصی Mitis-Salivarius Agar یا MSA (کیولب - کانادا) صورت گرفت و پس از مشاهده کلونی‌های مشکوک خالص سازی شدند. به منظور تایید بیوتیپی از تست‌های تخمیر کربوهیدرات، تست هیدرولیز آرژنین و همچنین بررسی آنزیم اوره‌آز استفاده گردید. شرایط انکوباسیون 24-48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با شرایط 5% CO_2 انجام پذیرفت (11).

شناسایی مولکولی جدایه‌های *S. mutans*, *S. sanguinis* - استخراج DNA

استخراج DNA از جدایه‌هایی که به صورت فنوتیپی تایید شده بودند با روش جوشاندن (بویلینگ) در دستگاه ترموبلاک BIOER انجام پذیرفت. جهت

و جذب همه چاهک‌ها در 550 نانومتر قرائت شد. از *S. mutants* ATCC 35866 به عنوان کنترل مثبت و از رنگ کریستال ویوله و محیط کشت TSB به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. شکل‌گیری بیوفیلم توسط فرمول‌های زیر طبقه‌بندی شده است: اگر (جذب نوری) $OD < OD_c$ بیوفیلم تشکیل نشده باشد (منفی)، اگر $OD_c < OD < 2 \times OD_c$ بیوفیلم ضعیف، اگر $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$ بیوفیلم متوسط و اگر $4 \times OD_c < OD$ بیوفیلم قوی خواهد بود (13).

جداسازی باکتریوفاژ از نمونه فاضلاب

برای جداسازی باکتریوفاژ، فاضلاب خام شهری تهیه گردید. به مدت یک شبانه روز در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس 6 میلی‌لیتر از فاضلاب به مدت 10 دقیقه در دور 6000g سانتریفیوژ و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. به منظور غنی‌سازی باکتریوفاژ به محلول صاف شده یک حجم یکسان از محیط BHI (مرک، آلمان) شامل *S. mutants*، *S. sanguinis* با کدورت نیم مک‌فارلند اضافه شد. یک شبانه روز در دمای 37 درجه انکوباسیون صورت پذیرفت. سانتریفیوژ مجدد کشت مایع در دور 6000g به مدت 10 دقیقه انجام و مایع رویی از یک فیلتر غشایی با اندازه 0/22 میکرومتر عبور داده شد. برای تایید حضور فائز لیتیک در مایع صاف شده از روش Double layer استفاده شد. بدین منظور 100 میکرولیتر از مایع صاف شده با 400 میکرولیتر از کشت باکتری (با کدورت نیم مک‌فارلند) به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به 4/5 میلی‌لیتر از محیط BHI آگار ذوب شده که تا دمای 50 درجه خنک گردیده، اضافه شد و گرماگذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز (به منظور تشکیل پلاک بر روی پلیت که نشانه وجود باکتریوفاژ لیتیک می‌باشد) انجام شد. این مراحل آنقدر تکرار گردید تا بتوان پلاک‌های لیتیک واضح و خوبی در

پلیت مشاهده شود. خالص‌سازی باکتریوفاژ با ریختن SM بافر و تکرار مراحل بالا به منظور به دست آوردن پلاک‌های یکدست و یکسان از فائز صورت پذیرفت (14).

تعیین مورفولوژی باکتریوفاژ

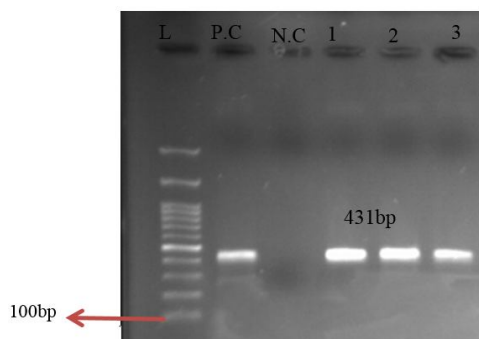
باکتریوفاژ جدا شده به لحاظ اندازه و شکل ظاهری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM دانشکده فنی دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی بررسی شد. بدین منظور از گرید مسی پوشیده شده با کربن استفاده شد. یک قطره نمونه فائز را بر روی آن ریخته و سپس با استفاده از اورانیل استات 2 درصد رنگ‌آمیزی شد و توسط میکروسکوپ TEM Zeiss-EM10C-100 KV دیده شد.

تعیین میزان و اختصاصیت باکتریوفاژ

برای تعیین میزان و اختصاصیت باکتریوفاژ از روش spot test استفاده شد. برای این منظور جدایه‌های *S. mutants* و *S. sanguinis* از پلاک دندان، *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 group A، *Streptococci* (*Streptococcus pyogenes* ATCC 12384) group B *Streptococci* (*Streptococcus agalactiae* ATCC 12386)، *Staphylococcus aureus* 25923 انتخاب شدند. هر گونه باکتری یک شبانه روز در محیط BHI مایع رشد داده شد تا در فاز لگاریتمی قرار گرفت. 100 میکرولیتر از هر کدام کشت باکتری‌ها را با 4 میلی‌لیتر از BHI 0/7 درصد خوب مخلوط کرده و سپس با آن سطح BHI آگار 1/5 درصد را پوشانده، پس از سفت شدن و بسته شدن محیط 10 میکرولیتر از باکتریوفاژ در سطح آگار ریخته شد، به طوری که سر سمپلر به سطح آگار تماس پیدا نکرد و یک شبانه روز در 37 درجه گرماگذاری شد. حساسیت به باکتریوفاژ به وسیله هاله شفاف مشخص گردید (15).

یافته ها

نتایج جداسازی *S. mutans* و *S. sanguinis* از پلاک دندان از کشت 150 نمونه پلاک دندان، کلنی های رنگ پریده آبی مشکوک به *S. mutans* و کلنی های سورمه ای رنگ حاشیه مضرسی مشکوک به *S. sanguinis* در نظر گرفته شدند. 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans* و 40 جدایه (26/67 درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. نتایج بررسی حضور ژن های اختصاصی برای تایید مولکولی جدایه های به دست آمده به شرح تصویر شماره 1 و 2 است:



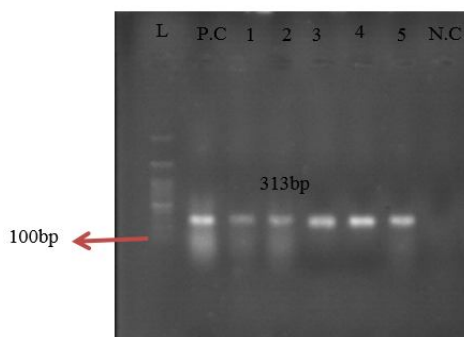
تصویر شماره 1: نتیجه الکتروفورز ژن *gtfD* اندازه باند 431 bp

L: Ladder 100 bp

P.C: کنترل مثبت سویه *S. mutans* ATCC35668

N.C: کنترل منفی (آب، پرایمرهای ژن *gtfD* Mastermix)

۱، ۲، ۳: نمونه های مورد بررسی حاوی ژن مورد نظر



تصویر شماره 2: نتیجه الکتروفورز ژن *gtfD* اندازه باند 313 bp

L: Ladder 100 bp

P.C: کنترل مثبت سویه *S. mutans* ATCC10556

N.C: کنترل منفی (آب، پرایمرهای ژن *gtfD* Mastermix)

۱، ۲، ۳، ۴، ۵: نمونه های مورد بررسی حاوی ژن مورد نظر

اثر مهارى فاژ بر رشد و مهار تشکیل بیوفیلم

برای بررسی اثر فاژ بر مهار رشد از دو روش لکه گذاری در آگار (Agar Spot) و روش چاهک (Well Diffusion) استفاده گردید. در هر دو روش ابتدا به صورت چمنی از کدورت معادل نیم مک فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* به صورت جداگانه بر روی محیط BHI آگار کشت داده شد و در یک پلیت 10 ماکرولیتر از باکتریوفاژ به صورت لکه در مرکز پلیت قرار داده شد و در پلیت دیگر ابتدا به کمک انتهای پیست پاستور استریل چاهک ایجاد کرده و 100 ماکرولیتر از کشت تازه حاوی کدورت نیم مک فارلند *S. mutans* و *S. sanguinis* ریخته و سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با شرایط 5% CO₂ انجام پذیرفت و قطر هاله عدم رشد به دست آمده بررسی شد. از کشت شبانه *S. mutans*، *S. sanguinis* در محیط TSB حاوی 2 درصد سوکروز، کدورتی معادل استاندارد 0/5 مک فارلند تهیه شد. سپس 100 ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با 50 ماکرولیتر از باکتریوفاژ در چاهک میکروتیتربلیت ریخته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد در شرایط 5% CO₂ گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری چاهک ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شسته شده و سپس خشک شدند. هر چاهک با 200 ماکرولیتر کریستال ویوله 1 درصد رنگ آمیزی گردید و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با دور 120rpm به مدت 15 دقیقه گرماگذاری شد. OD هر چاهک در 550 نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد (15). میزان درصد کاهش بیوفیلم هم با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید (16). هر آزمون سه بار تکرار پذیرفت.

$$\left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)} \right] \times 100$$

C = چاهک کنترل مثبت OD

B = کنترل منفی OD

T = چاهک نمونه مورد آزمون

تصویر شماره 3: پلاک لیتیک فاژ *S. sanguinis*

تصویر شماره 4: تصویر میگراف میکروسکوپ الکترونی (TEM).

مورفولوژی فاژهای خانواده Siphoviridae

نتایج اختصاصیت میزبان باکتریوفاژ لیتیک جدا شده به منظور تعیین اختصاصی بودن باکتریوفاژ برای *S. mutans* و *S. sanguinis* از روش spot test استفاده شد. سپس تعیین میزبان *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از پلاک دندان با استفاده از باکتری‌های زیر انجام پذیرفت. نتیجه به عنوان نمونه برای *S. mutans* به نمایش گذاشته شده است (تصویر شماره 5).

نتایج اثر مهار باکتریوفاژ لیتیک بر مهار رشد و مهار

تشکیل بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis*

نتایج اثردهی باکتریوفاژ بر مهار تشکیل بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* با روش رنگ سنجی کریستال ویوله در میکروتیتر پلیت 96 خانه‌ای در 550OD نانومتر، همانگونه که در جدول شماره 2 نشان داده شده است تا 96 درصد توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را پس از محاسبه فرمول (16) نشان می‌دهد (تصویر شماره 6).

نتایج توانایی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis*

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم توسط *S. mutans* و *S. sanguinis* پس از گرماگذاری، کدورت معادل استاندارد نیم مک‌فارلند باکتری در محیط TSB به همراه سوکروز 2 درصد و شست و شوی و سپس رنگ آمیزی با کریستال ویوله و جذب نوری در 550 نانومتر انجام گرفت، که جدایه‌های به دست آمده طیف متفاوتی از بیوفیلم قوی تا ضعیف را به نمایش گذاشتند، ولی در این میان جدایه‌های *S. mutans* بیوفیلم قوی‌تر را به نمایش گذاشتند. *S. mutans*: 10 مورد (15/38 درصد) بیوفیلم ضعیف، 45 مورد (69/23 درصد) بیوفیلم متوسط و 10 مورد (15/38 درصد) بیوفیلم قوی و در مورد *S. sanguinis*: 3 مورد (7/5 درصد) فاقد بیوفیلم، 12 مورد (30 درصد) بیوفیلم ضعیف، 20 مورد (50 درصد) بیوفیلم متوسط و 5 مورد (12/5 درصد) بیوفیلم قوی ایجاد نمودند.

نتیجه جداسازی باکتریوفاژ لیتیک علیه *S. mutans* و *S. sanguinis*

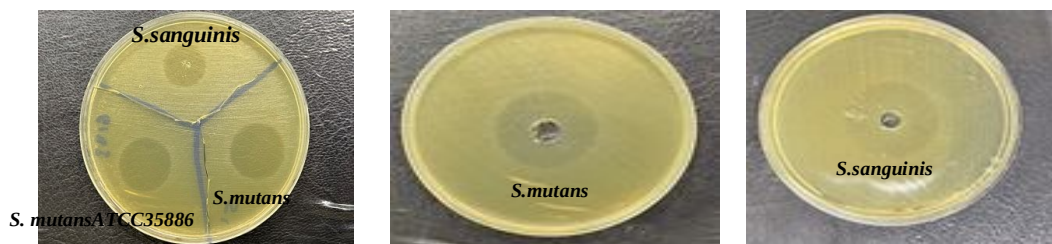
برای جداسازی باکتریوفاژ لیتیک مشاهده پلاک لیتیک باید صورت بگیرد. پس از جدا کردن اولیه باکتریوفاژ، به منظور خالص سازی آن یک پلاک از پلیت اولیه حاوی باکتریوفاژ با یک آنس استریل بریده و به کشت مایع 24 ساعته *S. mutans* و *S. sanguinis* اضافه شد و در نهایت به روش Double-layer agar پلاک گرفته شده و با استفاده از SM بافر پلاک ایجاد شده را از پلیت جداسازی شده و خالص گردید (تصویر شماره 3).

نتیجه تعیین مورفولوژی باکتریوفاژ

نتایج حاصل از بررسی TEM، باکتریوفاژ اختصاصی جدا شده از فاضلاب علیه *S. mutans* و *S. sanguinis* را نشان داد. باکتریوفاژ دارای سر Icosahedral (80 nm) و دم طولی غیر منقبض شونده (185 nm) متعلق به خانواده Siphoviridae می‌باشد (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 5: تعیین اختصاصیت میزبان به عنوان نمونه برای *S. mutans*



تصویر شماره 6: مهار رشد *S. mutans* و *S. sanguinis* توسط فاز لیتیک به روش A: انتشار در چاهک، B و C: لکه گذاری در آگار - از *S. mutans* ATCC35886 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

بسیار مناسبی برای استقرار *S. mutans* است. از 150 پلاک مورد بررسی 65 جدایه (43/33 درصد) *S. mutans* و 40 جدایه (26/67 درصد) *S. sanguinis* جداسازی شد. بررسی حضور *S. mutans* در سال 2017 توسط Abdulrahman و همکارانش در هند روی پلاک دندان نشان داد که از 65 نمونه پلاک مورد بررسی در افراد گروه سنی 33 تا 45 سال، 36 جدایه (55/38 درصد) *S. mutans* بودند که بیوتیپ I از *S. mutans* با 34 جدایه (94/44 درصد) بیشترین فراوانی را داشت و بین شاخص پوسیدگی و حضور *S. mutans* ارتباط معنی داری ($P < 0/05$) نشان داده شد (18). در سال 2018 در عراق، Aljarah و همکارانشان از 120 نمونه مختلف سواب از دهان، *S. mutans* 62 مورد (51 درصد) با بیشترین فراوانی در مقایسه با سایر اعضای خانواده *mutans* جداسازی گردید (19). مطالعات انجام شده در سال 2013 در شیلی توسط Vildosa و همکارانش بر 40 بیمار مستعد پوسیدگی دندان با دامنه سنی 18-50 سال نشان داد که 35 مورد (87/5 درصد) بر روی

جدول شماره 2: OD بیوفیلم تشکیل شده توسط *S. mutans* و

S. sanguinis قبل و بعد از اثر دهی با باکتریوفاژ در 550 نانومتر

نام باکتری	OD میانگین قبل از اثر دهی	OD میانگین بعد از اثر دهی
<i>S. mutans</i>	0/49	0/004
<i>S. sanguinis</i>	0/30	0/003

بحث

Streptococcus viridans، شامل گروه بزرگی از استرپتوکوک‌های آلفا همولیتیک همزیست ساکن دهان است که نقش مهمی در ایجاد پوسیدگی دارند. *S. mutans*، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری، میکروبیوم حفره دهانی انسان و از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی دندان است. *S. mutans* سوکروز را تخمیر می‌کند و با تولید اسید لاکتیک باعث ایجاد صدمه به مینای دندان می‌شود. هم‌چنین از سوکروز برای ساخت پلاک دندان استفاده می‌کند (17). *S. mutans* به عنوان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین عوامل ایجادکننده پوسیدگی دندان محسوب می‌شود. سطح دندان جایگاه اکولوژیکی

محیط‌های ترکیبی ارزیابی شده، برای *S. mutans* مثبت شدند (20).

در بررسی شیوع *S. mutans*، *S. sanguinis* و *S. salivarius* از دهان 20 نفر از افرادی که دارای دندان مصنوعی کامل بودند توسط Carlsson و همکاران در سال 1996، 17 مورد (85 درصد) *S. sanguinis*، 14 مورد (70 درصد) *S. mutans* جداسازی و *S. salivarius* از هیچ دندان مصنوعی جداسازی نگردید. که تفاوت فراوانی باکتری‌های به دست آمده در مقایسه با مطالعه ما می‌تواند علاوه بر جمعیت مورد مطالعه، تفاوت دندان مصنوعی و دندان پوسیده که به محیط مناسب به عنوان زیستگاه این استرپتوکوکوسی‌ها و هم‌چنین به تفاوت رژیم‌های غذایی و فرهنگ غذایی و همچنین به شرایط اقتصادی هم می‌توان اشاره نمود ولی فارغ از اختلاف درصدها نتایج نشان‌دهنده *S. mutans*، *S. sanguinis* به عنوان گونه‌های غالب جداسازی شده از پلاک دندان هستند و به نقش مهم این‌ها در ایجاد پوسیدگی می‌توان اشاره نمود (21).

در این مطالعه، برای بررسی سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم *S. mutans* و *S. sanguinis* جدا شده از نمونه‌های پلاک دندانی در ایجاد بیوفیلم، از میکروتیتر پلیت 96 خانه با TSB به همراه سوکروز 2 درصد و شست و شوی و سپس رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و جذب نوری در 550 نانومتر استفاده شد. نتایج حاکی از آن است که جدایه‌های به دست آمده توانستند طیف متفاوتی از بیوفیلم قوی تا ضعیف را به نمایش بگذارند ولی در این میان جدایه‌های *S. mutans*، بیوفیلم قوی‌تر را در مقایسه با *S. sanguinis* به نمایش گذاشت. در مطالعه Nobbs در سال 2009، با سنجش کریستال ویوله و استفاده از میکروتیتر پلیت، زیست توده بیوفیلم *S. Mutans* به تدریج از 0 تا 48 ساعت افزایش یافت. تشکیل بیوفیلم اولیه *S. mutans* را می‌توان در 24 ساعت مشاهده کرد (22).

بررسی ایجاد بیوفیلم در *S. salivarius* و *S. mutans* توسط Tamura و همکاران در پلیت 96 خانه نشان داد که *S. mutans* از قدرت تشکیل بیوفیلم بیش‌تری در

مقایسه با *S. salivarius* برخوردار است و علاوه بر این، در کشت‌های ترکیبی، *S. salivarius* به شدت از تشکیل بیوفیلم *S. mutans* جلوگیری کرد که در نظر گرفته شده است که تنظیم CSP (Competence-Stimulation Peptide) توسط *glrA* در *S. mutans* و غیر فعال‌سازی CSP توسط *S. salivarius* عملکردهای مهمی برای ارتباط سلول به سلول بین باکتری‌های بیوفیلم و استرپتوکوک‌های دهانی هستند (23). در بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط 5 استرپتوکوکوس شایع دهانی توسط Pita و همکارانش در سال 2015 به روش میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی کریستال ویوله نشان داده شد که *S. mutans* بیش‌ترین توانایی تشکیل بیوفیلم را داشت. سپس *S. cricentus*، *S. sorbinus*، *S. sanguinis* و *S. salivarius* به ترتیب دارای بیش‌ترین توانایی تشکیل بیوفیلم بوده‌اند (24).

نتایج مطالعه ما و مطالعات مشابه در ایران و خارج از ایران بیان می‌دارد که *S. mutans* در بیش‌تر موارد توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد. سایر استرپتوکوکوس ویریدانس‌های جدا شده هم توانایی تشکیل بیوفیلم نسبتاً خوبی را از خود به نمایش گذاشته‌اند که نقش مهمی در شکل‌گیری چندین باکتری و افزایش نفوذ ناپذیری لایه‌های بیوفیلم دارد و هم‌چنین دارای نقش موثر در افزایش بیماری‌زایی سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم هم‌چنین در مقایسه با کشت پلانکتونی می‌تواند با تحمل بالاتر نسبت به pH کم همراه باشد.

رویکردی که در این مطالعه به منظور مهار تشکیل بیوفیلم استفاده شد، استفاده از باکتریوفاز لیتیک علیه جدایه‌های بومی *S. mutans* و *S. sanguinis* بود. همان‌طور که میدانیم باکتریوفازها با تعدادی قریب به 10^{32} فراوان‌ترین گونه زیستی کره زمین به‌شمار می‌روند و نقشی حیاتی در تنظیم جمعیت باکتری‌ها ایفا می‌نمایند (25). از میان راهکارهای جایگزین برای پیشگیری و کنترل عفونت‌های باکتریایی، یکی از پرفرودارترین پیشنهادات استفاده مجدد از فائز درمانی است. طرفداران این رویکرد مزایای قابل توجهی برای این روش نسبت به

آنتی‌بیوتیک‌ها قائل هستند که از آن جمله می‌توان به اختصاصیت میزبان، تکثیر، تخریب بیوفیلیم‌ها و سمیت کم برای انسان اشاره نمود. مطالعات مختلفی تاکنون در زمینه فاز درمانی صورت گرفته است ولی مطالعات انجام شده روی باکتریوفاز لیتیک *S. mutans*، *S. sanguinis* بسیار کم می‌باشد و فقط مطالعاتی برای فاز *S. mutans* وجود دارد. در این مطالعه ما به جداسازی و تعیین هویت باکتریوفاز لیتیک علیه *S. mutans*، *S. sanguinis* پرداختیم. نتایج تعیین هویت باکتریوفازهای جدا شده با میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که باکتریوفاز لیتیک علیه جدایه‌های *S. mutans*، *S. sanguinis* متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند. نتیجه اثر نهایی باکتریوفاز لیتیک جدا شده در مطالعه ما بر مهار تشکیل بیوفیلیم به روش میکروتیتر پلیت نشان داد که تا 96 درصد قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه‌های *S. mutans* و *S. sanguinis* بودند.

بهشتی در سال 2015 (15) از آب دریای خزر و Dalmasso در سال 2015 (26) از بزاق، به عنوان منبع برای جمع‌آوری فازهای *S. salivarius* و *S. mutans* استفاده کرده‌اند، اما در مطالعه حاضر فاضلاب خام شهری به عنوان منبع جداسازی باکتریوفاز انتخاب شد. *Delisle & Rostkowski* فازهای خاصی را از بزاق انسان جدا کردند که اثرات لیتیک روی *S. mutans* داشت و متعلق به خانواده *Siphoviridae* بود (27). Dalmasso از غربالگری 85 نمونه بزاق، توانست فقط یک فاز را در برابر *S. mutans* جدا کند (26) و در سال 2003، Bachrach (28) و در سال 2004، Hitch (29) نتوانستند هیچ فاز را در برابر استرپتوکوکوس ویریدانس دهانی از بزاق جدا کنند. Ahmed و همکارانش در سال 2019 به جداسازی *S. mutans* از پلاک‌های دندان پرداختند و متعاقب آن به دنبال جداسازی باکتریوفاز لیتیک علیه آن در پلاک دندان پرداختند که موفق به جداسازی هیچ باکتریوفازی نشدند (30). علت این که مطالعات از بزاق و یا پلاک دندان موفق به جداسازی فاز نشده بودند

احتمالاً به دلیل دشواری جداسازی فازها از نمونه های حفره دهان و ایجاد کمبود اطلاعات در فازهای خانواده استرپتوکوکوس ویریدانس است. بنابراین داشتن یک منبع مناسب برای جداسازی باکتریوفازها بسیار مهم است. در مطالعاتی که همانند مطالعه ما موفق به جداسازی فاز لیتیک *Siphoviridae* شدند نشان داده می‌شود که فازهای خانواده *Siphoviridae* جزو فازهای لیتیک استرپتوکوکوس ویریدانس می‌باشند که طبیعتاً به خاطر فراوان بودن آن‌ها در طبیعت، جداسازی آن‌ها از منابع فاضلابی می‌تواند موثرتر از جداسازی بزاق و یا پلاک دندان باشد. مطالعه ما در مقایسه با مطالعات ذکر شده نشان داد که فاضلاب خام شهری منبع مناسب‌تری برای جداسازی فاز است و برخلاف سایر مطالعات که فقط یک نوع فاز *Siphoviridae* جداسازی شده بود در مطالعه حاضر موفق به جداسازی دو خانواده متفاوت فاز می‌شده‌ایم، که نشان از مناسب بودن منابع آبی و فاضلاب کشورمان جهت جداسازی فازهای جدید لیتیک *S. mutans*، *S. sanguinis* و *S. salivarius* است، همان‌گونه که بهشتی در سال 2015 (15) نیز دو خانواده جدید فاز برای *S. salivarius* که متعلق به خانواده *Streptococcus viridans* است، را از آب دریای خزر جدا سازی نمود. موفقیت درمان با باکتریوفازها به طور اولیه وابسته به تکنولوژی تجویز آن‌ها می‌باشد. موفق‌ترین تجویز فاز مسیر تجویز مستقیم سوسپانسیون آن بر روی منطقه عفونت می‌باشد و ایمونولوژی فازها هنوز به‌طور گسترده‌ای شناسایی نشده است. یکی از مشکلات جدی در ایمن بودن فاز درمانی پدیده فاز معتدل است که این فازها فقط قادر به قرار گرفتن در ژنوم باکتری هستند و این ممکن است سبب تغییر باکتری شود و باکتری را بیش‌تر مقاوم نماید، بنابراین مهم است که برای درمان از فاز معتدل استفاده نشود. شواهد پیشنهاد می‌دهد که باکتریوفازها به‌طور موثر بیوفیلیم را ریشه‌کن می‌کند. با توجه به خصوصیات خارق‌العاده فاز و کاربردهای مهم در صنعت و پزشکی در کنار گسترش روز افزون مقاومت

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح مصوب دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد اخلاق: IR-TUMS.SPH.REC.1398.208 می باشد. بدینوسیله مجریان طرح از معاونت محترم پژوهشی دانشکده پیراپزشکی و معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

آنتی بیوتیکی، رویکرد جدید استفاده از فاز علی الخصوص در درمان بیماری های ناشی از ایجاد بیوفیلیم مانند پلاک های دندانی و یا عفونت های ایجاد شده سوندهای ادراى و.... می تواند مورد استفاده قرار بگیرد، زیرا که قدرت نفوذ خیلی خوب و موثری را به درون بافت بیوفیلیم می تواند داشته باشد.

References

1. Forssten SD, Bjorklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2(3): 290-298.
2. Birlutiu V, Birlutiu RM, Costache VS. Viridans streptococcal infective endocarditis associated with fixed orthodontic appliance managed surgically by mitral valve plasty. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(27): e11260.
3. Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. *Can J Microbiol* 2011; 57(1):1-20.
4. Khanafari A, Hosseini PS, Ebrahimi TM. Investigation of probiotic chocolate effect on *Streptococcus mutans* growth inhibition. *Jundishapur Journal Microbiology* 2012; 5(4): 590-597 (Persian).
5. Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, Azeredo J. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol* 2015; 23(4): 185-191.
6. Sulakvelidze A, Kutter E. Bacteriophages: biology and applications, in Bacteriophages, Boca Raton: CRC Press; 2005.
7. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* 2010; 28(591-595).
8. Jenny F: Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Res Updat* 2011; 14(2): 125-139.
9. Chibani CS, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Brussow H. In vitro and invivo bacteriolytic activities of *Escherichiacoli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(7): 2558-2569.
10. Jassim SAA, Limoges RG. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages The living Drugs. *World Journal Microbial Biotech* 2014; 30(8): 2153-2170.
11. Fancello L, Desnues C, Raoult D, Rolain JM. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(11): 2448-2454.
12. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48(3): 195-199.
13. Jafari Sh, Mobasher MA, Najafipour S, Ghasemi Y, Mobasher N, Naghizade MM, et al. Evaluation of *chlorella vulgaris* extract inhibitory effects on growth, proliferation and biofilm formation by *S. mutans* and evaluation of its toxicity, *J Fasa University of Medical Sciences* 2015; 5(2): 387-396 (Persian).

14. Nikkhahi F, SoltanDallal MM, Alimohammadi M, Rahimi FA, Rajabi Z, Fardsanei F, et al. Phage therapy: assessment of the efficacy of a bacteriophage isolated in the treatment of salmonellosis induced by *Salmonella enteritidis* in mice. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017; 10(2): 131-136.
15. Beheshti MK, Bouzari M, Arbabzadeh ZF. Biotechnological applications of two novel lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans* in tooth decay bio-controlling. *Curr Res Bac* 2015; 8(4): 90-100.
16. Mahdavi M, Jalali M, Kermanshahi RK. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. *Res Pharm Sci* 2009; 2(2): 113-118.
17. Mosaddad S.A, Tahmasebi E, Yazdani A, Rezvani M.B, Seinfeldian A, Yazdani M & et al. Oral microbial biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; 38: 2005-2019.
18. Abdulrahman SH, Senthikumar R, Imran Kh, Panneer SK. Isolation and Typing of *S. mutans* and *Streptococcus sobrinus* from Caries-active Subjects. *Contemp Clin Dent* 2017; 8(4): 587-593.
19. Aljarah A, Malik SA, Zainab R. Isolation and identification of *Streptococcus mutans* from dental caries by using SM479 gene. *Indian J Public Health Res Dev* 2018; 9(10): 667-670.
20. Vildosola GP, Fluxa PP, Saavedra ZP, Godoy FE, Batista O, Cortes MG. Recovering *S. mutans* over restorations by the tray technique-a randomized clinical study. *Braz J Oral Sci* 2013; 12(4): 292-297.
21. Carlsson J, Söderholm I, Almfeldt I. Prevalence of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans* in the mouth of persons wearing full-dentures. *Arch Oral Biol* 1996; 14(3): 243-249.
22. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73(3): 407-450.
23. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, et al. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(2): 152-161.
24. Ehrenfest DDM, Wang HL, Bernard JP, Miato T, Sammartino G. New biomaterials and regenerative medicine strategies in periodontology, oral surgery, and esthetic and implant dentistry. *Biomed Res Int* 2015; 2015(210792): 1-3.
25. Cui Z, Gue X, Feng T, Li L. Exploring the whole standard operating procedure for phage therapy in clinical practice. *J Transl Med* 2019; 17(373):1-7.
26. Dalmaso M, Hass E, Neve H, Strain R, Cousin JF, Stockdale RS, et al. Isolation of a novel phage with activity against *S. mutans* Biofilms. *PLOS ONE* 2015; Online Published: 0138651.
27. Delisle AL, Rostkowski CA. Lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans*. *Curr J Microbiol* 1993; 27(3): 163-167.
28. Bachrach G, L-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Appl Microbiol* 2013; 36(1): 50-53.
29. Hitch G, Pratten J, Taylor PW. Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Lett App Microbiol* 2014; 39(2): 215-219.
30. Ahmed H, Flockhart A, Foley S & Foley J. Isolation of *Streptococcus mutans* and its bacteriophage from human plaque samples. *Saudi J Oral Dent Res* 2019; 4(8): 561-564.