Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Baghdad
College of Dentistry

ASSESSMENT OF SELECTED IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR SALIVARY BIOMARKERS AND SURFACE ADHESIN GENE (SpaP) OF STREPTOCOCCUS MUTANS IN RELATION TO DENTAL CARIES AMONG GROUPS OF CHILDREN

A dissertation submitted to the Council of the College of Dentistry at the University of Baghdad, in partial fulfilment of requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Preventive Dentistry

By
Maitha Sameer Kadhim
B.D.S, M.Sc.

Supervised by
Prof. Dr. Ahlam Taha Mohammed
(B.D.S, M.Sc, Ph.D. in Preventive Dentistry)

2023 A.D. **1444 A.H.**

ABSTRACT

Introduction: Dental caries is replied to be one of the oldest and most prevalent diseases affecting humans, it is an oral pathology associated with both lifestyle and genetic factors. The caries process can be influenced by salivary composition, which includes ions and proteins as well as protein polymorphisms. Historically, there has been a lack of studies concerning the genetic aspect of dental caries in the Iraqi population. This case-control study was carried out in order to compare some salivary proteins concentration (acidic proline-rich protein, sertory-IgA, and carbonic anhydrase VI) between severe caries and caries-free children to detect one of three acidic-proline rich protien allele of the PRH1 gene locus (Db) and two single nucleotide polymorphisms (rs 2923234, rs 1049112) in relation to dental caries. Polymerase chain reaction-based methods in the detection of Streptococcus mutans based on primers for the 16S rRNA gene, therefore investigated if sucrose-independent adhesion gene spaP of Streptococcus mutans in associated with the development of dental caries.

Materials and Methods: DNA was obtained from a saliva sample for 80 preschool Iraqi children aged between3-5 years old, according WHO criteria they were divided into case group which included 40 children with a severe type of caries and 40 children free of caries. Oral examination was done by assessment of dental plaque, caries experience. Detection of salivary protein levels was done by using of enzyme-linked immunosorbent assay kits. Genomic DNA was extracted directly using the Norgen® saliva DNA extraction kit protocol. According to the result of polymerase chain reaction samples in gel electrophoresis; 416-base product represents the Db allele, while the 519-base product represents the other two SNPs (rs 2923234, rs 1049112) for being used in the sequencing portion. Streptococcus mutans DNA extracted according to Genomic DNA isolation kit instructions, then gel documentation with the high-resolution camera

have been used to capture the image and analyze the bands, where the bands with a size of 507bp represent 16srRNA gene and bands with 192bp represent spaP gene that indicated the presence of Streptococcus mutans bacteria.

Results: According to the present study mean level of acidic proline-rich protein was higher among group with severe caries(case group) than that of the control group (caries-free) with a statistically significant difference. However, the mean level of secretory-IgA and carbonic anhydrase enzyme VI were found lower among the case group in comparison to the control group with a significant difference. With respect to plaque index, a significant difference was found between the two groups, it was higher in case groupe. In children with severe caries, Db allele frequency was 38.5%, however, In caries-free children, it was 61.5% with no significant differences between study groups. A significant difference was identified in single nucleotide polymorphisms rs 2923234 which was higher in heterozygous-mutant (A-C) genotype among the control (caries-free) group than children with severe caries. No statistically significant difference detected single nucleotide polymorphisms (SNPs) of rs1049112 between study groups. In all subjects, the prevalence of Streptococuss mutants 16srRNA gene was 98.8% positive and 1.2% negative. Regarding the adhesion gene spaP, a significant difference was detected between study groups, (spaP) gene was positive in 92.5% of case group as compared to 50% of control group.

Conclusion: According to result of this study salivary protein plays important role in the development and diagnosis of dental caries in children. No association between the Db allele and dental caries while a protective effect against dental caries was found in relation to rs 2923234 SNP. The findings of this study reveal adhesin gene spaP of Streptococcus Mutans was a match and predicted individual in caries development.

الخلاصة

المقدمة: يعتبر مرض تسوس الأسنان أحد أقدم الأمراض التي تصيب الإنسان وأكثرها انتشارًا ، فهو من أمراض الفم المرتبطة بنمط الحياة والعوامل الوراثية. تسوس الاسنان هو نتيجة تفاعل العوامل المضيفة ،والعدوى الجرثومية. يمكن أن تتأثر عملية التسوس بمكونات اللعاب ، والذي يشمل الأيونات والبروتينات وكذلك تعدد أشكال البروتين المتعلقة بالجينات ، مع هذا هناك نقص في الدراسات بشأن الجانب الوراثي لتسوس الأسنان للشعب العراقي.

أهداف الدراسة: أجريت هذه الدراسة لمقارنة تركيز بعض البروتينات اللعابية (البروتين الغني بالبرولين الحمضي (a-PRP ، s-IgA ، و Carbonic anhydrase VI) بين الأطفال الذين يعانون من تسوس الأسنان الشديد والاطفال الذين ليس لديهم تسوس،بالاضافة للكشف عن الاختلافات الجينية للبروتين الغني بالبرولين الحمضي ويشمل Db alleleواثنين من تعدد اشكال النوكليوتيد المفردة (rs 2923234) و (rs 1049112) فيما يتعلق بتسوس الأسنان، استخدام الطرق المستندة إلى تفاعل البوليمراز المتسلسل في الكشف عن بكتريياالمكورات المسبحية الميوتانس بناءً على الجين الريباسي 16S rRNA . بالاضافة للتحقق في ما إذا كان جين الالتصاق spaP لبكتريياالمكورات المسبحية الميوتانس مرتبطًا بتطور تسوس الأسنان.

المواد وطرق العمل : تم الحصول على الحمض النووي من عينة اللعاب لـ 80 طفلاً عراقيًا في سن ما قبل المدرسة تتراوح أعمارهم بين 3-5 سنوات ، تم تقسيمهم إلى مجموعة حالة تضمنت اربعون طفلاً مصابين بنوع شديد من التسوس وومجموعة ضابطة تضمنت اربعون طفلاً خاليًا من التسوس. تم إجراء فحص الفم من خلال تقييم الصفيحة الجرثومية وقياس مستوى تسوس الاسنان. تم الكشف عن مستويات البروتين اللعابي باستخدام تقنية مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) ، كما وتم استخلاص الحمض النووي الجيني مباشرة باستخدام بروتوكول مجموعة استخراج الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين من اللعاب. وفقًا لنتيجة عينات تفاعل البلمرة المتسلسل في الرحلان الكهربائي للهلام ؛ تمثل الحزمة الجزيئية ذات اربعمائة وستة عشر قاعدة Db allele ، بينما تمثل الحزم ذات خمسمائة وتسعة عشر قاعدة (rs 2923234، rs 1049112) حيث تم استخدامها من اجل كشف التسلسل الجيني.فيما يخص بكتريا المكورت المسبحية الميوتانس تم استخراج الحمض النووي وفقًا لتعليمات مجموعة عزل الحمض النووي الجينومي للبكتريا ، ثم تم استخدام التوثيق الهلامي بالكاميرا عالية الدقة لالتقاط الصورة وتحليل الحزم الجزيئية ، حيث تمثل الحزم بحجم خمسمائة وسبعة الجين الريباسي 16S rRNA الذي

أشار إلى وجود بكتيريا المكورات المسبحية الميوتانس وتمثل الحزم ذات مئة واثنان وتسعون نقطة الجين spaP والذي يشير الى قابلية البكتريا على الالتصاق.

النتائج : وفقًا للدراسة الحالية ، كان متوسط مستوى البروتين الغني بالحمض البرولين أعلى بين المجموعة المصابة بالتسوس الشديد (مجموعة الحالة) من مجموعة االضابط(الخالية من التسوس) مع وجود فرق معنوي احصائي. بينما كان مستوى تركيز s-IgA وإنزيم CAVI أقل بين مجموعة الحالة مقارنة بالمجموعة الضابطة مع وجود فرق معنوي احصائي. فيما يتعلق بمؤشر البلاك ، وجد فرق معنوي بين المجموعتين ، حيث كان أعلى في مجموعة الحالة. كان تواتر جين Dbاعلى في الأطفال الذين لا تسوس لديهم من الأطفال الذين يعانون من تسوس شديد مع عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية بين مجموعتي الدراسة. تم تحديد فرق معنوي في تعدد الأشكال النوكليوتيد الفردي rs 2923234 حيث كان أعلى في النمط الوراثي (A-C) بين المجموعة االضابطة (الخالية من تسوس الأسنان) من الأطفال الذين يعانون من تسوس شديد. كما ولم يكتشف أي فرق ذي دلالة إحصائية فيا يتعلق بتعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة لـ rs1049112 بين مجموعتي الدراسة. في جميع العينات ، كان انتشار جين16srRNA لبكتريا المكورات المسبحية الميوتانس بين مجموعات الدراسة،98.8 ٪ إيجابيًا و 1.2 ٪ سلبيًا.وفيما يتعلق بجين الالتصاق spaP، تم الكشف عن اختلاف معنوي بين مجموعات الدراسة ، حيث كان اعلى في مجموعة الحالة.

الاستنتاج: وفقًا لنتيجة هذه الدراسة ، يلعب البروتين اللعابي دورًا مهمًا في تطوير وتشخيص تسوس الأسنان عند الأطفال. كما تم العثور على تأثير وقائي ضد تسوس الأسنان فيما يتعلق بـ rs 2923234. كشفت نتائج هذه الدراسة أن جين الالتصاق spaP لبكتريا المكورات المسبحية الميوتانس يمكن ان يستخدم كمؤشر للقابلية على التسوس عند الاطفال.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
كلية طب الأسنان

تقييم مجموعة مختارة من مؤشرات اللعاب المناعية والجزيئية وجين الالتصاق السطحي (spaP) لبكتريا المكورات المسبحية الميوتانس فيما يتعلق بتسوس الأسنان بين مجموعات من الأطفال

اطروحة مقدمة الى مجلس كلية طب الاسنان / جامعة بغداد
كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في طب الاسنان الوقائي

قدمت من قبل
ميثاء سمير كاظم
بكالوريوس طب وجراحة الفم والاسنان
ماجستير طب الاسنان الوقائي

اشراف
أ.د. احلام طه محمد
بكالوريوس طب وجراحة الفم والاسنان
ماجستير طب الاسنان الوقائي
دكتوراه طب الاسنان الوقائي

1444 هـ **2023 م**