------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 4، ص58-70،2011------

عزل جراثيم Treponema الفم من جيوب ما حول الاسنان المصابة وتشخيصها مظهريا

سمية عدنان صالح محمد **أميرة محمود محمد الراوي**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

E-mail :zkhaldon@yahoo.com

(تاريخ الاستلام 7/ 6 / 2011 ؛ تاريخ القبول 20 / 7 / 2011)

الملخص

تضمنت الدراسة اعتماد بعض الاختبارات التشخيصية المظهرية للتحري عن امكانية عزل جراثيم Treponema الفم من عينات جيوب ما حول الاسنان المصابة، شملت هذه الاختبارات فحص مسحات مثبتة محضرة من العزلات الجرثومية وصبغها بصبغة كرام وكرام المحورة وصبغة فونتانا تحت المجهر الضوئي حيث لوحظت الاشكال الحلزونية المميزة للجراثيم. كما شخصت Treponema الفم بملاحظة خلاياها الحلزونية المتحركة بنشاط في المسحات الرطبة باستخدام مجهر الطور المتباين. هذا وتم تأكيد عزل وتشخيص هذه الجراثيم بعد مفاعلتها مع الاجسام المضادة المتخصصة ووضوح خلاياها الحلزونية باللون الأخضر البراق عند تسليط ضوء UV عليها باستخدام المجهر المتألق، اضافة الى اننا تمكنا من ازالة الغلاف الخارجي (O.M.) باستخدام مادة Triton X-100 وتحرير اسواطها وصبغها بصبغة السوط الخاصة.

Isolation and Morphological Identification of Oral Treponema from Infected Periodontal Pockets

Summaya A. S. Mohammed **Amera M. M. Al-Rawi**

Department of Biology

College of Science

University of Mosul

Email:zkhaldon@yahoo.com

ABSTRACT

The study included the relying of some phenotypic tests to investigate the possibility of isolation and identification of oral Treponema from infected periodontal pocket samples. These phenotypic tests included the examination of fixed smears prepared from the bacterial isolates and staining them with gram and modified gram's stain and with Fontana stain under light microscope where the distinct spiral forms of germs were seen. The oral Treponemes also identified by the observation of their actively motile spiral cells in wet smears using phase contrast microscope. The isolation and identification of these bacteria also proved after their interaction with specific antibody and cell clarifying by greenish spiral form when illuminated with U.V. light using fluorescence microscope. Further, the isolation and identification of oral Treponema was continued by the removal of their outer membrane (O.M.) using Triton X-100 and releasing their flagella and staining with specific flagella stain.

Key words: Morphological Identification of Oral Treponema, Endoflagella Staining of Spirochetes.

المقدمة

تعود أنواع الملتويات المتواجدة في فم الإنسان الى الجنس Treponema ضمن العائلة Spirochetaceae، وهي عصيات سالبة الكرام شديدة الالتواء تتكون (كما في الملتويات الأخرى) من اسطوانة سايتوبلازمية محاطة بالغلاف الخارجي واسواط محيطية Peripheral flagella والتي تنشأ شبه نهائية عند قطب الاسطوانة السايتوبلازمية. تستعمل هذه الجراثيم خيوطاً حلزونية طويلة تسمى الأسواط وتكون مطمورة في الفراغ حول البلازم Periplasmic space (وهو الفراغ بين معقد جدار الخلية – الغشاء الداخلي (بمعنى اسطوانة الخلية) والغشاء الخارجي (Outer sheath) لذلك يطلق عليها اسواط محيطية، وان موقع الاسواط هذا يساعد في إبقاء شكل الخلية (Willey *et al*., 2008 ; Nester *et al*., 2004) . وتتحكم هذه الاسواط بشكل خلية الجرثومة اذ انها تلتف باتجاه من اليسارLeft-handed حول اسطوانة الخلية بحيث تعطي الخلية شكلا غير منتظم تتميز فيه مناطق حلزونية Helical region ومناطق مستويةPlaner region

وفي حال انفكاك الاسواط عن اسطوانة الخلية فإنها تتخذ الشكل الحازوني الملتوي تجاه اليمين–Right handed helices (Li *et al*., 2000).

توجد أنواع Treponema الفم بصورة رئيسة كفلورا مايكروبية وبإعداد قليلة في تجويف اللثة، مرتبطة مباشرة مع الخلايا الطلائية لجيوب حول الأسنان وهي من المستوطنات السائدة للصفيحة الجرثومية تحت اللثة عند مرضى التهاب ما حول الأسنان المتفاقم والمزمن وان بعضها يرتبط مع تحطيم الأنسجة الناعمة بسبب إنتاجه الأنزيمات الهاضمة للبروتينات أو بسبب تحفيزه التفاعلات الالتهابية مؤدياً بالنهاية إلى تحطيم أنسجة ما حول الأسنان فضلاً عن تسببه برائحة الفم الكريهة Oral malodor (Rosen *et al* ., 1994).

وقد وضعت أنواع Treponema الفم ضمن ثلاثة أنماط Phylotypes بالاعتماد على ابعاد الخلية وعدد الأسواط وهي الملتويات الصغيرة Small Spirochetes وتشمل *T. denticola* و*T. socranskii* و *T. pectinovorum* ، الملتويات المتوسطة الحجم Medium-sized Spirochetes وتشمل أفراد النوع *T.vincentii* ، الملتويات الكبيرة Large Spirochetes والتي لم تعزل في مزارع نقية. وقد سجل النوعان *T.denticola* و *T.vincentii* لآن يكونا أكثر الأنواع شيوعا في عينات فم الإنسان (Umemoto *et al*.,1997).

وبسبب الأهمية الطبية لجراثيم Treponema الفم بوصفها أحد أهم الممرضات الحقيقية لإصابات الفم وبسبب قلة الاهتمام بعزل ودراسة هذه الجراثيم كونها لاهوائية صعبة الإرضاء والتنمية فقد جاءت هذه الدراسة المحلية الأولى لتتحرى عن إمكانية اعتماد بعض الطرائق التشخيصية المظهرية في عزل وتشخيص هذه الجراثيم .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1. جمع العينات Samples Collection: جمعت 139 عينة من جيوب ما حول الأسنان بعمق $\leq$ 3 ملم وللفترة من 2008/11/3 ولغاية 2009/6/8 من المرضى المصابين بالتهاب ما حول الأسنان Periodontitis وبإشراف طبيب أسنان اختصاص بأمراض ما حول الأسنان وتحت ظروف معقمة. تم عزل منطقة الجيب باستخدام القطن Cotton roll وبعد إزالة الصفيحة الجرثومية فوق اللثة Supragengival Plaque باستخدام القطن Cotton Pellet تم قياس عمق الجيب باستخدام المسبار Periodontal Probe وإدخال ألـ Paper Point في داخل الجيب إلى قاعدته وتركه لمدة دقيقة واحدة (Kasuga *et al*., 2000) ثم رفعه ووضعه في أنبوبة الاختبار الحاوية على 0.5 سم^3 من الوسط الناقل المختزل Reduced Transport Media (Umeda *et al*., 1990) باستخدام ملقط معقم ونقلت إلى المختبر لإجراء ألاختبارات البكتريولوجية.

كما تم سحب 5 سم^3 من دم بعض المرضى الذين جمعت منهم عينات جيوب ما حول الأسنان ووضع في أنبوبة اختبار غير حاوية على مادة مانعة للتخثر ثم فصل المصل عن الخثرة بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق ثم حفظ المصل بدرجة - 20° م لحين الاستخدام.

2. الأوساط الزرعية Culture media : حضر وسط Trypton- Yeast Extract- Glucose- Volatile fatty Acid- Serum (TYGVS) medium المحور بالاعتماد على ما جاء في (Miyamoto *et al.*, 2006) وأضيف إليه 0.5 غرام من مادة Sodium thioglycolate و2.0غرام من مادة Sodium bicarbonate وIsobutyric acid بنسبة 0.2 % ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى7.2 و بعد التعقيم أضيف مصل الأرنب بنسبة 2% والمضاد الحيوي Rifampcin بتركيز 0.2 ملغم / 100 سم^3 (Stam *et al.*, 2001 ; Uitto *et al.*,1988).

لقح 0.1 سم ^{3} من الوسط الناقل المختزل الملقح بالعينة في وسط TYGVS medium وحضن في جار لاهوائي Anaerobic jar مجهز من شركة Oxiod مع أنبوب يحتوي على كاشف الظروف اللاهوائية Anaerobic indicator (Resazurin) وتم تفريغ الجار من الهواء باستخدام جهاز تفريغ الهواء Vaccume ثم أضيف إليه 10% من غاز ثاني أوكسيد الكربون و80% من غاز النيتروجين من القناني الخاصة بكل نوع من الغازين وحضن الجار في درجة 37°م لمدة لا تتجاوز 5 أيام .

3. الألختبارات التشخيصية Diagnostic tests : أجريت عدة اختبارات مظهرية تضمنت تحضير مسحات وفحصها مجهرياً وكما هو موضح أدناه:

اولاً : التحضيرات الجافة Dry preparation**:** حضرت مسحات جافة من النمو الجرثومي وصبغت بصبغة كرام وكرام المحورة، كما حضرت مسحات جافة ثانية وصبغت بصبغة فونتانا الخاصة بجراثيم Spirochetes (Collee *et al.*, 1996) لمشاهدة الأشكال الحلزونية المميزة للجرثومة وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة تكبير 1000X وصورت فوتوغرافياً بكاميرا رقمية .

ثانياً : التحضيرات الرطبة Wet preparation: حضرت مسحات رطبة من الجرثومة النامية في الوسط السائل وفحصت بمجهر الطور المتباينPhase contrast الموجود في كلية الطب البيطري في جامعة الموصل / وحدة التلقيح الاصطناعي تحت قوة تكبير 400X و 1000X لمشاهدة شكل وحركة الجرثومة وصورت بكاميرا خاصة بالمجهر .

ثالثاً : الفحص بمجهر التألق المناعي Immunoflourescence microscope : أجري التشخيص التأكيدي لجراثيم Treponema الفم بالطريقة الآتية:

* المصل المضاد Antisera**:** استخدمنا مصل إنسان كمصل مضاد كما وصفه(Umemoto *et al.*,1988) والمحضر كما ورد في فقرة جمع العينات .

* معاملة خلايا الجرثومة مع المصل المضاد: عومات الخلايا الجرثومية المراد تأكيد تشخيصها مع المصل المضاد اعتماداً على ما ورد في (McDowell *et al.*, 2005) وكالآتي:

- وضع 0.25 مايكروليتر من معلق الجرثومة النامية في الوسط السائل على شريحة زجاجية خاصة تحتوي على 12 حفرة وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ليلة كاملة Over night .
- في اليوم التالي غمرت الشريحة بالأسيتون ووضعت في الثلاجة لمدة 15دقيقة لغرض التثبيت ثم جففت في الهواء .
- أضيف 0.25 مايكروليتر من المصل المضاد لكل حفرة وحضنت عند 37°م لمدة 30 دقيقة ثم غسلت الشريحة ثلاث مرات بمحلول PBS يحتوي على Tween 20 ثم جففت في الهواء .
- أضيف 10 مايكروليتر من مضاد المصل Human conjugate (وهو عبارة عن Anti-human-IgG، بتخفيف 5:1 ; من شركة Euroimmun) لكل حفرة وحضن عند 37 °م لمدة 30 دقيقة ثم غسلت ثلاث مرات بمحلول PBS يحتوي على Tween 20 ثم جففت في الهواء .
- فحصت الشريحة بمجهر التألق المناعي تحت قوة تكبير 400X وصورت فوتوغرافياً بكاميرا رقمية في مختبر الصحة العامة المركزي / بغداد .

رابعاً : صبغ السوط Flagella Stain: تم إزالة الغلاف الخارجي (Outer Sheath) وتحرير الأسواط الداخلية للجرثومة وصبغها كصفة تشخيصية فريدة للجرثومة وكالاتي :

* تحضير الصبغة **:** كما ورد في (West *et al.*, 1977) من المواد الآتية:

1. المحلول الأول (المرسخ) Solution 1 (Mordant) : وحضر بمزج المحاليل الآتية: (25 سم^3) من محلول مشبع منAluminum Potassium Sulfate، (50 سم^3) من محلول 10% من Tannic acid، (5 سم^3) من محلول 5 % من Ferric Sulfate، المحلول الناتج أصبح لونه أسود وحفظ في الظلام بدرجة 4 °م .

2. المحلول الثاني (الصبغة) Solution 2 (Stain): وحضر بالإضافة التدريجية البطيئة لهيدروكسيد الأمونيوم المشبع إلى 90 سم^3 من محلول 5% نترات الفضة إلى أن تكون راسباً بنياً لا يذوب، بعدها أضيفت زيادة من محلول 5% نترات الفضة إلى أن أستقر ضباب ضئيل، حفظ محلول الصبغة في الظلام بدرجة 4°م.

* إزالة الغلاف الخارجي Removal of the outer sheath: أتبعت الخطوات المذكورة من قبل الباحثين (Ruby *et al.*,1997) و (Wyss,1998) والتي تنص على ما يأتي:

- لقحت خلايا فتية من الجرثومة في وسط TYGVS broth وحضنت في الظروف المثالية.
- تم الحصول على راسب خلايا الجرثومة بإجراء الطرد المركزي المبرد بدرجة -4°م بسرعة 6000Xg لمدة 25 دقيقة .

- تم غسل راسب الخلايا بمحلول الملح الفسلجي ، وكررت العملية مرتين .
- أضيف 1% من مادة Triton X-100 (مجهزة من شركة Scharlan) إلى الخلايا المغسولة وحضنت عند 37°م لمدة 60 دقيقة وذلك لإزالة الغلاف الخارجي .
- بعد التحضين غسل راسب الخلايا مرة واحدة وأعيد تعليقه في محلول الملح الفسلجي .

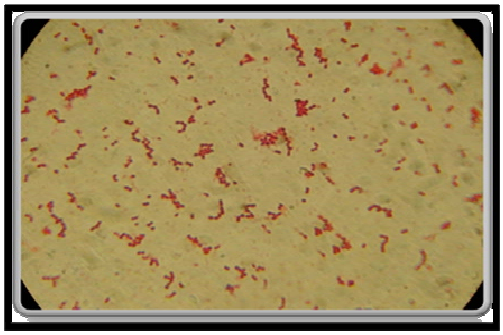
* صبغ السوط: صبغت الأسواط المتحررة باستخدام صبغة السوط حسب ما ورد في (West *et al.*,1977) وكما يأتي:

- حضرت مسحة من معلق الخلايا في المحلول الفسلجي والمزال عنها الغلاف الخارجي بنشرها على شريحة زجاجية نظيفة وتركت لتجف في الهواء .
- غطيت المسحة بالمحلول 1(المرسخ) لمدة أربع دقائق ثم غسلت الشريحة بلطف بالماء المقطر وهي محمولة أفقياً.
- غطيت المسحة بالمحلول 2 (الصبغة) مع التسخين إلى أن تصاعد البخار وتركت الصبغة على الشريحة لمدة أربع دقائق (استخدمت طريقة التسخين بوضع الشريحة على فوهة بيكر زجاجي سعة 125 سم^3 يحتوي على ماء مغلي) .
- غسلت الشريحة وهي محمولة أفقياً بماء مقطر للتخلص من رواسب الصبغة وجففت في الهواء وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة 1000X وصورت فوتوغرافياً بكاميرا رقمية.

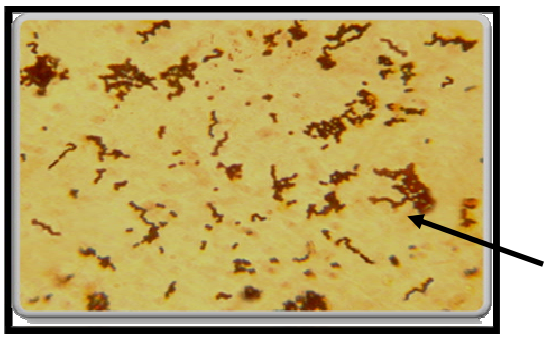
النتائج والمناقشة Results and Discussion

تم الحصول على نسبة عزل 66.9% لجراثيم Treponema من جيوب ما حول الأسنان بمعدل عمق 5 ملم و تم تمييز شكل خلاياها مجهريا كما موضح أدناه

اولاً: المسحات الجافة: بدت الخلايا الجرثومية في المسحات المثبتة المصبوغة بصبغة كرام المحورة بانها جراثيم سالبة لصبغة كرام حلزونية بأطوال مختلفة بعضها ملتو بشدة وبعضها ضعيف الالتواء كما موضح في الصورة (1) كما انها ضعيفة الاصطباغ بصبغة السفرانين. بدت الخلايا حلزونية بشكل اوضح عند صبغها بصبغة فونتانا الخاصة بجراثيم الملتويات اذ ظهرت الخلايا ملتوية ذات لون بني غامق مائل للأسود مع أرضية صفراء باهتة كما ظهرت بعض الخلايا متجمعة مكونة ما يدعى عش التوالد Breeding nests وهذا ما توضحه الصورة (2).



الـصورة 1: خلايـا جـراثيم Treponema مصبوغة بصبغة كرام المحورة تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 1000X



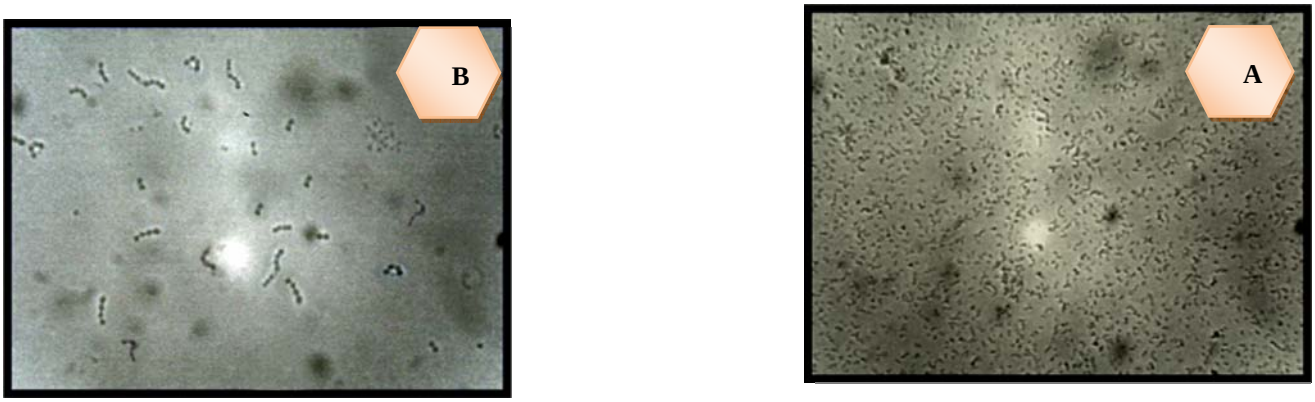
عش التوالد

الصورة 2: خلايـا جـراثيم Treponema مـصبوغة بصبغة فونتانا تحت المجهر الضوئي بقـوة تكبير 1000X

بين الباحثون أن كل أنواع الملتويات متشابهة مظهرياً عند فحصها بالمجهر الضوئي وأحياناً توجد بشكل سلاسل ملتوية بقوة Tightly coiled او ضعيفة الالتواء Loosely wounds او ان الالتواء غير منتظم Irregular coiled كما انها جراثيم سالبة لصبغة كرام وتصطبغ بمستوى ضعيف بالصبغة المضادة السفرانين. وفي حين ان جراثيم الملتويات الكبيرة مثل Borrelia يمكن أن تصطبغ بطرائق التصبيغ الاعتيادية ومنها صبغة كرام (تبدو سالبة لصبغة كرام)، صبغة لشمان، صبغة كيمزا، الا ان الملتويات الصغيرة مثل Treponema وLeptospira فإنها رقيقة جدا ولا يمكن مشاهدتها بطرائق التصبيغ الاعتيادية وتشاهد بحال افضل في التحضيرات الرطبة غير المصبوغة تحت مجهر الحقل المظلم اذ يلاحظ شكلها وحركتها، أما في التحضيرات المثبتة فيجب استخدام طريقة الاشباع بالفضة والتي تزيد سمك هذه الجراثيم بعد ترسب الفضة عليها كما في طريقتي Fontana (للمسحات المثبتة على الشرائح الزجاجية) وطريقة Levaditi (للمقاطع النسيجية) (Brooks *et al* ., 2007 ; Prescott *et al* ., 2005 ; Collee *et al* ., 1996).

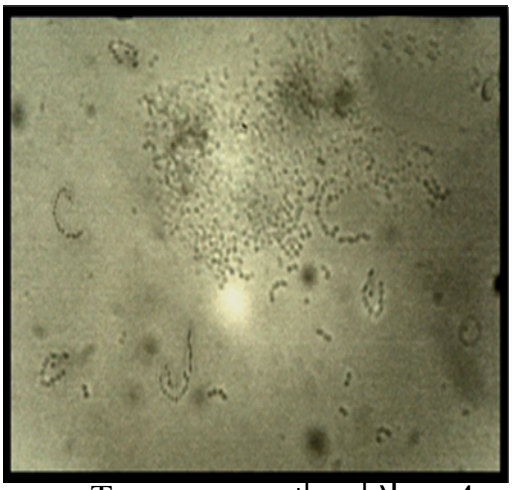
ثانياً : المسحات الرطبة: تمت ملاحظة الخلايا الحية المتحازنة والملتوية بانها تتحرك بنشاط عند فحصها بمجهر الطور المتباين Phase contrast كما في الصورة (3: A وB) وبدا بعضها بشكل خلايا مفردة متحركة بنشاط كما ظهرت بعض الخلايا ضعيفة الحركة وبشكل سلاسل طويلة مجتمعة كما موضح في الصورة (4)، كما لوحظت بعض الاشكال الكروية Sphere forms وهذا بسبب تأثير الاوكسجين الجوي عليها اثناء الفحص والذي يجعلها تتكور لتصبح بشكل اجسام كروية. ان فحص المسحات الرطبة يعد من الفحوصات المفيدة والفعالة في تشخيص جراثيم Treponema الفم بوصفها الكائنات الوحيدة المتحركة من بين أحياء مجهرية الفم إذ أشار الباحثان Baehni وGuggenheing (1996) إلى إن الفحص ألمجهري لعينات

الصفيحة الجرثومية بطريقة المسحة الرطبة يعطي دلائل أولية حول وجود أحياء مجهرية معينة مثل جراثيم الملتويات المتحركة إلا انه لا يميز بين أنواعها.



الصورة 3: خلايا جراثيم Treponema تحت مجهر الطور المتباين

A: قوة تكبير 400X B: قوة تكبير 1000X

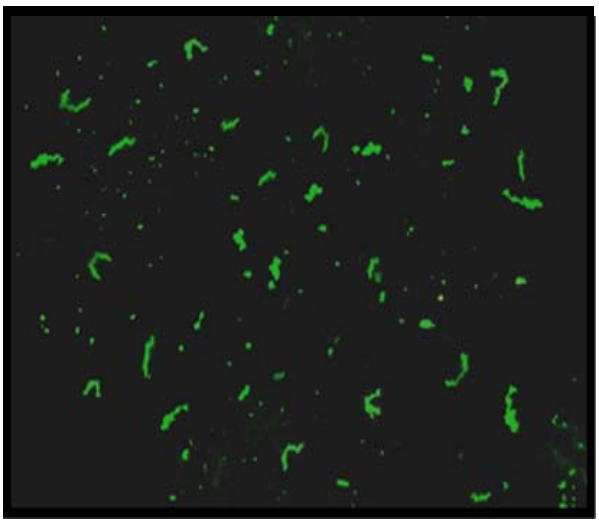


الصورة 4: خلايا جراثيم Treponema متجمعة وعلى شكل سلاسل تحت مجهر الطور المتباين بقوة تكبير **1000X**

اعتمد الباحث Moter وجماعته (1998) على المسحة الرطبة في تقدير العدد الكلي للجراثيم في عينات الصفيحة الجرثومية تحت اللثة تحت قوة تكبير 1000X وأشاروا إلى أهمية إجراء فحص المسحة الرطبة سواء بمجهر الحقل المظلم أو مجهر الطور المتباين بوصفها طريقة سهلة جداً وموثوقة لتمييز جراثيم الملتويات المتحركة بشكل عام إلا انه لا يعتمد عليه في تشخيص نوع معين من هذه الجراثيم ذلك لتشابه مظهرها الخارجي العام. وقد أشار الباحث Izard وجماعته (2001) إلى أن الخلايا الطويلة التي تظهر بشكل

سلاسل هي عبارة عن عدة خلايا Treponema تمر بمرحلة انقسام الخلية وغير قادرة على الحركة بشكل فعال مقارنة مع الخلايا المفردة. كما أشار (Kardum *et al*., 2001) إلى أهمية المسحات الرطبة في فحص عينات الصفيحة الجرثومية للكشف عن جراثيم Treponema المتحركة وانها تزود معلومات حول شكل وحجم الخلية بذلك فهي تميزها بسهولة عن الاحياء الاخرى مثل العصيات والكرويات الغير متحركة، كما انها طريقة سريعة للتأكد من حيوية جراثيم Treponema في العينة. وأشاد الباحثون(Moreira *et al*.,2001) بأهمية المسحات الرطبة لفحص عينات من الصفيحة الجرثومية للتحري عن وجود واعداد جراثيم الملتويات المتحركة خاصة قبل وبعد العلاج للتأكد من كفاءة الجرعة العلاجية.

ثالثاً : الفحص بمجهر التألق المناعي: تم تأكيد عزل جراثيم Treponema الفم بعد ملاحظتها بمجهر التألق المناعي الموجود في مختبر الصحة العامة المركزي/بغداد وذلك لتفاعلها مع الجسم المضاد المتخصص وظهور خلاياها بلون اخضر براق بعد إضافة Human conjugate والذي ارتبط مع الجسم المضاد في (Human antisera) مكوناً المعقد المناعي (الجرثومة-الجسم المضاد للجرثومة-Conjugate) فظهرت خلايا الجرثومة باللون الأخضر البراق عند تسليط ضوءUVعلى هذا المعقد (الصورة5).



الصورة 5: خلايا جراثيم Treponema المتألقة باللون الاخضر تحت مجهر التألق المناعي بقوة تكبير 400X .

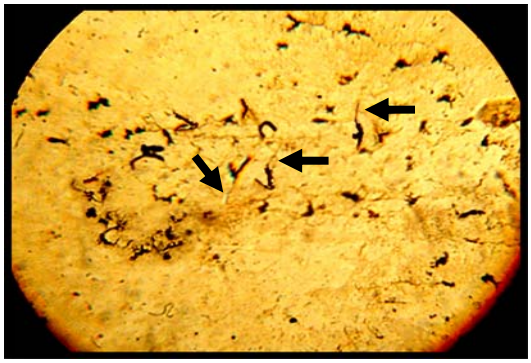
أجرينا الاختبار بالطريقة غير المباشرة Indirect immunofluorescence وذلك باستخدام اجسام مضادة من الانسان Human antiseraاذ تم الحصول عليها من دم المرضى المصابين بالتهاب ما حول الأسنان (والذين عزلت منهم الجرثومة من جيوب ما حول الاسنان) لاحتوائه على الأجسام المضادة المتخصصة للجرثومة لذا ارتبطت مع خلايا الجرثومة المثبتة على الشريحة الزجاجية الخاصة بالاختبار وفي

نفس الوقت ارتبطت مع Human conjugate المضاف لها وهو عبارة عن ضد للأجسام المضادة للإنسان Anti-human antibody وعند تكون المعقد المناعي ظهر اللون الاخضر البراق عند الفحص بمجهر التألق المناعي.

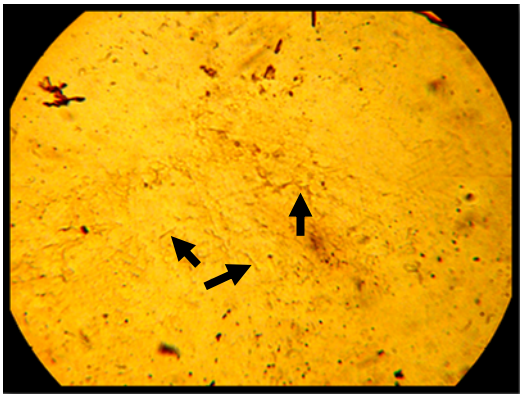
تعد طريقة التشخيص بالتألق المناعي Immunofluorescen تقنية تشخيص دقيقة ومقنعة بسبب خصوصية التفاعل بين المستضدات والأجسام المضادة لها كما يمكن الكشف عن الجراثيم حتى في حالة وجودها بأعداد قليلة (Goering *et al*., 2008). وقد أجرى الباحثون (Umemoto *et al*., 1988) اختبار التألق المناعي وباستخدام نوعين منAntiseraاحدهما محضر من دم أشخاص مصابين بالتهاب ما حول الأسنان ليمثل Human antisera والذي سيرتبط معه Human conjugate (مضاد الأجسام المضادة للإنسان Anti-human antibody) ليتكون المعقد المناعي، أما الـ Antisera الأخر فقد حضره الباحثون بحقن معلق الجرثومة في وريد الأرنب لتحفيز تكوين الأجسام المضادة للجرثومة (Rabbit antisera) والتي عند ارتباطها معRabbit conjugate مضاداً للأجسام المضادة للأرنب (Anti-rabbit antibody) سيتكون المعقد المناعي. كما اتبع الباحثون (McDowell *et al*., 2005) طريقة التألق المناعي وذلك بتحضير اجسام مضادة متخصصة ضد بروتين السوط (A) للجرثومة بحقنه في وريد الارنب وبعد الحصول على الاجسام المضادة (Rabbit antisera) أضيفت إلى الجراثيم المثبتة على الشريحة بالأسيتون ثم اضاف Rabbit conjugate ولاحظ تكون المعقد المناعي.

رابعاً : صبغ السوط : تمكنا في الدراسة الحالية من إزالة الغلاف الخارجي Outer Sheath لجراثيم Treponema وتحرير سوطها الداخلي وباستخدام مادة Triton-X100 لإذابة الغلاف الخارجي (O.S.) وبعد صبغها بصبغة السوط وفحصها بالمجهر الضوئي تحت قوة 1000X لوحظ أنها أصبحت اشد تحازناً واقصر مما عليه قبل المعاملة كما مبين في الصورتين (6 و7) مع بقائها محتفظة بقدرتها على الحركة عند مشاهدتها بمجهر الطور المتباين. وهذه الصفة تعد ميزة فريدة لمجموعة الملتويات فهي المجموعة الوحيدة من الجراثيم المتحركة التي يكون سوطها ملتفاً حول جسم الخلية ومحاطاً بالغلاف الخارجي (O.S.) لذلك يطلق عليها الاسواط الداخلية Endoflagella ولأجل مشاهدتها يجب أولاً إزالة (O.S.) ليتسنى بذلك فك التفافها عن جسم الخلية مما يؤدي إلى حدوث التغيير في شكل وطول الخلية وهذا ما اكده (Girons *et al*., 2000). وحيث أن شكل خلايا الملتويات انما هو نتيجة التفاعل المعقد بين الاسواط المحيطية (PF_s) واسطوانة الخلية وان هذه الاسواط المحيطية الواقعة بين اسطوانة الخلية والغلاف الخارجي (O.S.) تسيطر على شكل الخلية بطريقة فريدة ومميزة فبعض خلايا الجرثومة تبدو ضعيفة الالتواء Loosely coiled وقليل منها ملتوية بشدة Tightly coiled واغلبها يكون غير منتظم الالتواء Irregularly coiled ذات مناطق مستوية Flat planner ومناطق حلزونية Helices وان PFs تلتف حول محور جسم الخلية بالاتجاه من اليمين Right - handed sense عند مناطق الخلية التي تكون مستوية أما عند مناطق الخلية التي تكون حلزونية Helical فان PFs

تمتد على طول محور الخلية لذا نجد أن الخلايا التي أُزيل عنها O.S وانفك التفاف الاسواط حول محور الخلية تبدو بشكل حلزون ملتف باتجاه من اليمين Right handed ولا تظهر فيها المناطق المستوية فيصبح شكلها حلزونياً منتظماً وهذه النتائج تبين أهمية O.S في الحفاظ على شكل الخلية (Ruby *et al*., 1997).



الصورة 6: الاسواط المحيطية لجراثيم Treponema المرتبطة بالخلية بعد صبغها بصبغة السوط الخاصة تحت المجهر الضوئي بتكبير 1000X



الصورة 7: الاسواط المحيطية لجراثيم Treponema بعد انفصالها عن الخلية تحـت المجهـر الضوئى بتكبير 1000X

أشار الباحثون (Wolgemuth *et al*., 2006) في دراستهم على سلالات ذات النمط البري Wild type متحركة وأخرى طافرة غير متحركة إلى إن اغلب خلايا النمط البري لها شكل ملتو غير منتظم على طول جسم الخلية إذ تظهر المنطقتان الحلزونية والمستوية وقليل منها يكون شديد الالتواء وعند إزالة الغلاف الخارجي فان السوط لن يبقى ملتفاً بقوة حول جسم الخلية وإنما يفك التفافه فتتحول الخلايا ذات الشكل غير المنتظم إلى خلايا اشد تحلزناً يلتوي فيها الحلزون باتجاه من اليمين Right-handed والذي يشير الى علاقة هذا الشكل مع مواد البيتيدوكلايكان.

المصادر الأجنبية

Baehni, P. C. ; Guggenhein, B. (1996). Potential of diagnostic microbiology for treatment and prognosis of dental caries and periodontal disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* , **7**(3), 259-277.

Brooks, G. F. ; Butel, J. S. ; Morse, S. A. (2007). "Jawetz, Melinck and Adelerg's Medical Microbiology". 24th edn. , McGraw-Hill Inc. , USA.

Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. ; Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney "Practical Medical Microbiology". 14th edn. , Churchill Livingstone Inc. , New York.

Goering, R. V. ; Dockrell, H. M. ; Wakelin, D. ; Zuckerman, M. ; Chiodini, P. L. ; Roitt, I. M. ; Mims, C. (2008). "Medical Microbiology". 4th edn. , Mosby, China.

Girons, S. ; Chi, B. ; Kuramitus, H. (2000). Development of shuttle vector for Spirochetes. *J. Mol. Microbial. Biotechnol*. , **2**(4), 443-445.

Izard, J. ; Samsonoff, W. A ; Limberger, R. J. (2001). Cytoplasmic Filaments deficient of *Treponema denticola* has pleiotropic defect. *J. Bacteriol*. , **183**(3), 1078-1084.

Kardum, M. I. ; Beader, N. ; skaljac, G. S. (2001). Diagnostic methods for evaluation of microbial flora in periodontitis. *Acta Stomatol Croat*, **35**(1), 137-140.

Kasuga, Y. ; Ishihara, K. ; Okuda, K. (2000). Significant detection of *Porphyromonas gingivalis*, *B. forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pocket. *Bull. Tukyo. dent. Coll*. , **41**(3), 109-117.

Li, C. ; Abdul Motaleb, M. ; Sal, M. ;Goldstein, S. F. ; Charon, N. W.(2000). Spirochete periplasmic flagella and motility. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. , **2**(4),345-354.

McDowell, J. V. ; Lankford, J. ; Stamm, L. ; Saldon, T. ; Gordon, D. L. ; Marconi, R. T. (2005). Demonstration of factor H- like protein -1 binding to *Treponema denticola* a pathogen associated with periodontal disease in human. *Infect. Immun*. , **73**(11),7126-7132.

Miyamoto, M. ; Ishihara, K. ; Okuda, K. (2006). The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades Interleukin-1β (IL- 1β), IL- 6 and TNF Alpha. *Infect. Immun.* , **74**(4),2462-2467.

Moreira, A. N. ; Caniggia, L. F. ; Ferreira, R. C. ; Veronica, C. ; Alonso. C. ; Piovano, S. (2001). Effect of supragingival plaq control on subgingival microflora and periodontal tissue. *Pesqui, Odontol. Bras*. , **15,**119-126.

Moter, A. ; Hoenig, C. ; Choi, B. K. ; Riep, B. ; Göbel, U. B. (1998). Molecular epidemiology of oral Treponema associated with periodontal disease. *J. Clin. Microbiol.* , **36**(5),1399-1403.

Nester, E. W. ; Anderson, D. G. ; Robert, C. E. ; Pearsall, N. N. ; Nester, M. T. (2004). "Microbiology" a human perspective. 4th edn., McGraw-Hill, New York.

Prescott, L. M. ; Harley, J. P. ; Klein, D. A. (2005). " Microbiology". 6th edn. , McGraw-Hill , Inc. , USA.

Rosen, G. ; Naor, R. ; Kutner, S. ; Sela, M. N. (1994). Characterization of fibrinolytic activities of *Treponema denticola* . *Infect. Immun*., **62**(5),1749-1754.

Ruby, J. D.; Li, H.; Kuramitsu, H.; Norris, J. S.; Goldstein, S. F. ; Buttle, K. F. ; Charon, N. W. (1997). Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology. *J. Bacteriol*. , **179**(5), 1628-1635.

Stamm, L. V. ; Bergen, H. L. ; Shangraw, K. A. (2001). Natural Rifampcin resistance in *Treponema* spp. correlates with presence of N531 RopB Rifampcin cluster 1 . *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **45**(10), 2973-2974.

Uitto, V. J. ; Grenier, D. ; Chan, E. C. S. ; McBride, B. C. (1988). Isolation of chymotrypsin –like enzyme in *Treponema denticola*. *Infect. Immun*., **56**(10) , 2717-2722.

Umeda, M. ; Ishikawa, I. ; Benno, Y. ; Mistouka, T. (1990). Improved detection of oral spirochetes with an anaerobic culture methods. *Oral Microbiol. Immunol. ,* **5**, 90-94.

Umemoto, T. ; Zambon, J. J. ; Genco, R. J. ; Namikawa, I. (1988). Major antigens of human oral Spirochetes associated with periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* , **2**(2), 292-296.

Umemoto, T. ; Nakazawa, F.; Hoshino, E. ; Okada, K. ; Fukunaga, M. ; Namikawa, I. (1997). *Treponema medium* sp. nov. isolated from human subgingival dental plaque. *Int. J. Sys. Bacteriol.* , **47**(1),67-72.

West, M. ; Burdash, N. M. ; Freimuth, F. (1977). Simplified silver-plating stain for flagella. *J. Clin. Microbiol*. , **6**(4),414-419.

Willey, J.M.; Sherwood, C.M. ; Woolverton, C.J. (2008). "Prescott, Harley, and Klein's Microbiology". 7th edn., McGraw Hill, Sydney.

Wolgemuth, C. W. ; Charon, N. W. ; Goldstein, S. F. ; Goldstein, R. E. (2006). The flagellar cytoskeleton of the Spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotech*. , **11**, 221-227.

Wyss, C. (1998). Flagellins but not endoflagellar sheath proteins of *Treponema palllidum* and pathogen related oral Spirochetes are glycosylated. *Infect. Immun*. , **66**(12), 5751-5754.