



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية - كلية العلوم
قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الاسنان لدى طلبة كلية العلوم

بحث تقدم به الطالب (اسعد محمد لفتة) الى مجلس
كلية العلوم قسم علوم الحياة وهو جزء من متطلبات
نيل شهادة البكالوريوس كلية العلوم/علوم الحياة

بإشراف: - أ.د. ميثم غالي يوسف

2019م

1440هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

((اللَّهُ الَّذِي خَلَقَكُمْ مِنْ ضَعْفٍ ثُمَّ جَعَلَ مِنْ بَعْدِ
ضَعْفٍ قُوَّةً ثُمَّ جَعَلَ مِنْ بَعْدِ قُوَّةٍ ضَعْفًا وَشَيْبَةً
يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ وَهُوَ الْعَلِيمُ الْقَدِيرُ))

سورة الروم

الآية 54

الاحياء

الى صاحبة القلب الكبير العظيمة العطاء سديدة النصح وعنوان الوفاء

تلك التي حملتني وهنا على وهن وفصالي في عامين

ملهمتي وقدوتي.....أمي

الى مساندي ومساعدتي في الحياة الذي لولاه لما وصلت لما انا عليه الان

ذلك الذي تكبد عناء الأيام ليخرجني بأهني صورة

مساعدتي في الحياة.....أبي

الى كل من ساندي ووقف معي تشجيعا لي

اخوتي بالله واصدقائي

اهدي هذا العمل المتواضع عرفانا واحتراما لكل من ساندي ووقف معي

الشكر والتقدير

اتقدم بالشكر الى رئاسته قسم علوم الحياة وكذلك

اتقدم بالشكر والتقدير الى مشرف البحث الدكتور

ميثم غالي يوسف كذلك الى كل من قدم يد العون

لمساعدتي في اكمال هذا البحث

مثميا لهم الموفقية والنجاح الدائم

Abstract الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لغرض التحري عن البكتريا المسببة لتسوس الاسنان Streptococcus mutans لدى طلبة كلية العلوم وتضمنت الدراسة عزل وتشخيص هذه البكتريا من خلال زرعها على الوسط الزرعى الملائم لهذه البكتريا وتمت التجربة بإجراء الفحص على 30 عينة من كلا الجنسين شملت 15 عينة ذكور و15 عينة اناث حيث اخذت من اسنان المجرى عليهم الفحص مسحة بواسطة Swap معقم وتم زرع العينات على وسط اكار الدم وحضنت فترة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة التجربة كليا أوضحت النتائج وجود بكتريا Streptococcus mutans في اسنان 4 من الذكور و3 من الاناث بمجموع 7 إصابات وتم التأكد منها وذلك بإجراء الفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية.

المقدمة

INTRODUCTION

المقدمة Introduction

تسوس الأسنان مرض تسببه العديد من الأحياء المجهرية وخاصة البكتيريا والفطريات وهو مرض معد وقابل للانتقال من الأشخاص المرضى الى الأصحاء، يحد التسوق نتيجة تحطم موضعي لأنسجة السنية بفعل انزيمات البكتيريا (Tery, 1994) فالتسوس ينشأ في بادئ الأمر في بقعة بيضاء عديمة الألم وتتطور هذه البقعة الى تجايف مع ظهور صبغات ذات لون يقي ، يحد الالم يسلب التحفيز الحراري او بسبب تناول الحلويات والطعام والشراب الحامض (Consummars, 1997)

وتعد البكتيريا *Streptococcus mutans* احدى المسببات الرئيسية لتسوس الأسنان وهي بكتريا موجبة الصبغة كرام حالة الدم من نوع-م، تتواجد بشكل رئيسي في الحليب والماء والخضر و السبيل المعوي للإنسان وهي بكتيريا غير متحركة و غير مكونة للابواغ وتحتاج الى وسط غني بالدم ومصل الدم لغرض النمو (Notte, 1982;Gapte,1982)

يعد تسوس الأسنان من أكثر الأمراض انتشاراً، على مستوى العالم لذلك نال اهتمام المختصين و الباحثين في مجال طب الأسنان لكونه يشكل مشكلة بالغة الصعوبة لذوي الاختصاص علاوة على انه يسبب ألم شديدة أكثر من الأمراض المعدية الأخرى، فضلا على انه يبقى العامل المسؤول عن فقدان معظم الأسنان في الأعمار جميعها دون غيره من المسببات. (Murray, 1989)

يعود سبب تسوس الأسنان وتقدمه إلى مراحل متطورة بشكل رئيسي لوبائية جرثومة *Streptococcus mutans* وجرثومة العصيات اللبنية *Lactobacillus* في تجويف الفم. إن مصدر هذه الجراثيم وغيرها قد يكون داخلية (Endogenous) والمتمثل بالفلورا الطبيعية (Normal flora) أو خارجيا (Exogenous) كما في البكتيريا الملوثة لمينا الأسنان من البيئة المحيطة كالغذاء والماء نتيجة لعدم الاهتمام بنظافة الأسنان أو الافتقار للتعقيم أو لانخفاض حساسية البكتيريا لمواد تنظيف الأسنان بفعل آليات المقاومة التي تمتلكها، وبالتالي فإن ازدياد أعداد الجراثيم في التجويف الفمي (Oral cavity) يكون ما يسمى بالأغشية الحيوية (Biofilms) والتي تمثل نقاط ارتباط هذه الجراثيم بسطوح المواد الحية وغير الحية، ترسب

هذه الأغشية على مينا الأسنان يكون ما يعرف بالصفحة السنية (Dental plaque) وهذا ما يؤدي إلى تسوس الأسنان (Touyz, 2001), (Costerton and Donlon, 2002)

ينتج التسوس بسبب حدوث تحطم موضعي للأنسجة السنية بفعل افرازات الجراثيم الموجودة في الفم ويعتبر التهاب اللثة التهاب شائع يصيب الأنسجة الرخوة (الناعمة) او حافات اللثة الملامسة للأسنان وان وجود انسلاخ في اللثة ناجم في حالات كثيرة عن التهاب ما حول الأسنان ، الذي ينتج عن تطور افات تسوس الأسنان على سطح الجذر (Leary and Hix, 1997) ، فضلا عن أن التهاب ما حول السن يكون مسبوقا بالتهاب اللثة (Consumers , 1997) .(research magazine

تلعب الجرثومة السبحية *militans* و عصيات الحليب *Lactobacillus* والبكتيريا الخيطية *Actinomyces sp.* دورا مهما في حدوث الإصابة بمرض تسوس الأسنان وتكوين الخراجات الناجمة عن تسوس الأسنان ومن العوامل المؤثرة على تسوس الأسنان هو النظام الأنزيمي في الصفحة السنية للجراثيم الموجودة على سطح الأسنان مما يجعل الجراثيم قادرة على انتاج حامض *Lactic acid* من بقايا الكربوهيدرات القابلة للتخمر ومنها السكروز الذي يسبب تسوس الأسنان من خلال زيادة مسامية الصفحة السنية ، و عند التخمر يصبح الوسط حامضيا والذي يساعد على زيادة أعداد البكتيريا *S.mutans*

(Zero , et al . , 1994)

أن الاختلافات البيئية في الفم تختلف باختلاف العمر ، وينعكس ذلك على تركيب النبيت الجرثومي المجهرى، فعند الولادة يتكون الفم من الأنسجة الناعمة فقط مثل اللسان والشفنتين وسقف الفم، والتي تحتفظ بالرطوبة بواسطة افرازات الغدد اللعابية، ويكون الفم معقما عند الولادة لكن سرعان ما يستعمر من قبل الجراثيم المحيطة به خصوصا من الام في اثناء الرضاعة، فتكون بذلك جرثومة المكورات السبحية *S.salivarius* هي السائدة بنسبة 98% من مجموع النبيت الجرثومي، وبعد ظهور الأسنان بعد مرور (6-9) اشهر يستعمر الفم من قبل جرثومة المكورات السبحية *S.mutans* وتستعمر اللثة اجناس مختلفة من الجراثيم اللاهوائية، وان هذا التعقيد يزداد بمرور الوقت (Davis et al., 1990).

وصف البكتريا المسببة لتسوس الأسنان:

البكتريا المسببة لتسوس الاسنان مكورات لا هوائية اختيارية موجبة لصبغة كرام توجد عادة في تجويف الفم البشري وهو المساهم الرئيسي في تسوس الأسنان نتيجة لاضمحلال يمكن أن يؤثر بشكل كبير على الصحة العامة للفرد (whiley,2013).

تقع بكتريا المكورات المسببية Streptococcus mutans ضمن مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهي من أبرز الأنواع البكتيرية المكونة للأغشية الحيوية؛ إذ إنها تستوطن الفم خلال الأيام الأولى بعد الولادة وبمرور الوقت تتواجد أنواع أخرى مرافقة للسبحات من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Lamont and Jenkinson, 2010)

بكتريا Streptococcus mutans متوسطة الحرارة تنمو في درجات حرارية ما بين (18 - 40)م°، وهي الأكثر شيوعا لدى الأطفال والرضع ونقل المورثات هي المسؤولة عن انتقال الطافرة من الأمهات إلى الأطفال (Javed,2013).

المكورات العقدية هو المرض الرئيسي لتسوس الأسنان بسبب القدرة على الالتزام والتراكم على سطح الأسنان والاستجابة المناعية والفطرية والتكيفية هما الجوانب الرئيسية للجهاز المناعي التي تستجيب للالتهابات مثل تسوس الأسنان.

تدخل البكتريا المسببة لتسوس الاسنان إلى الفم والأنسجة المخاطية المرتبطة لغدد خارجية الإفراز والغدة اللعابية يساهم في إنتاج تجويف الفم لأن هذه المناطق مسؤولة عن تكوين مستضد يحتوي على الخلايا الداخلية والأجسام المضادة للبكتريا عن طريق الفم، فللأجسام المضادة إفرازية مضادة ضد تسوس الأسنان، والاستجابة المناعية هي الخلايا البلعومية التي يمكن أن تقتل البكتريا عن طريق عدة آليات (Web MD).

التصنيف العلمي

Kingdom:- bacteria

Phylum:- firmicutes

Class:- bacilli

Order:- Lactobacillales

Family:- streptococcace

Genus:- streptococcus

Species:- s .mutans

بكتريا تسوس الاسنان يمكن تحديدها من خلال بقعة طباشيرية بيضاء على سطح الأسنان مما يشير إلى مجال من تنقية المينا الذي يشار إليه عادة باسم آفة التسوس، فإنه يمكن أن يتحول لون السن إلى اللون البني وسوف يؤدي إلى تجويف في نهاية المطاف، كما يمكن أن تسبب رائحة الفم الكريهة وأمراض اللثة (Spiller M)

وتعتبر جزء من الفلورا الطبيعية من فم الإنسان لكن يمكن أن تنتقل من شخص لآخر عن طريق الانتقال الأفقي أو العمودي مسار انتقال البكتريا المسببة لتسوس الاسنان هو استعمار المضيف البشري بين نفسها.

المواد وطرق العمل

**MATERIAL AND
METHODS**

المواد وطرق العمل: -

تم جمع 30 عينة من طلبة كلية العلوم قسم علوم الحياة المرحلة الرابعة للدراسة الصباحية من كلا الجنسين وذلك للبحث عن البكتريا المسببة لتسوس الاسنان والكشف عن نسبة الإصابة لدى الطلبة

المواد والاجهزة المستخدمة: -

1- اطباق بتري Petri dishes

2- زجاجيات مختبرية

3- كابينة الزرع المختبري Hood

4- الحاضنة Incubator

5- مصباح بنزن Lamp burner

6- صفيحة حرارية Hot plate

7- وسط اكار الدم Blood agar

وتم تعقيم جميع الأدوات قبل العمل المختبري

طريقة اخذ العينات: -

يتم أخذ العينات بواسطة Swap قطني معقم منعا لتلوث العينة بالبكتيريا الأخرى وتحفظ العينة في مكان معقم لحين الزرع على الوسط الزرع

وسط اكار الدم Blood agar

بيئة غنية Enriched Media تنمو عليها معظم البكتيريا بيئة تفرقية Differential بين أنواع البكتيريا المحللة للدم عن طريق التحلل الكامل للدم Beta hemolytic مثل Sterpt. Pyogenes و Sterpt. Agalactiae أو التحلل الجزئي للدم مثل Alpha hemolytic مثل Sterpt. Pneumonia و Sterpt. Viridans أو عدم التحلل للدم Non hemolytic مثل Sterpt. Faecalis و Sterpt. Bovis .

طريقة الزرع: -

بعد ان تم أخذ العينات يتم تحضير الوسط الزرع ويصب في اطباق بتري يتم تعليمها لكل عينة ويترك الوسط ليتصلب.

بعد تصلب الوسط يتم أخذ العينة ويتم تخطيطها على الوسط وتحضن في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية بشكل مقلوب منعا لتكون بخار الماء على الوسط وتترك مدة 24 ساعة في الحاضنة.

جمع العينات Collection of samples

جمعت عزلات بكتيرية من عدة اشخاص من خلال مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المصابين بأخماج الفم والأسنان الذين راجعوا المراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية إذ أخذت المسحات بإشراف الطبيب المختص وإستخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل (Transport imedia swabs) في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات

العزل والتشخيص البكتيري Bacterial isolation and identification

العزل Isolation

زرعت عينات المسحات القطنية Swabs المأخوذة من أخماج الفم بعد أن تم حضنها بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢4 ساعة لغرض تنشيط البكتريا بطريقة التخطيط على الأوساط الزرعية الإغائية كوسط أگار الدم والماكونكي بطريقتي الزرع الهوائي واللاهوائي، وحضنت الأطباق لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧°م وبعد إكمال عملية الحضان أجريت الفحوصات المظهرية والكيموحيوية.

التشخيص المختبري:

شخصت العزلات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية باستخدام الطرق الروتينية في الفحوصات البايوكيميائية لهذا الغرض معتمدين على أساس الخصائص الزرعية cultural characteristics من خلال أشكال المستعمرات النامية وخصائصها ونموها على الأوساط الزراعية التفريقية وكذلك الخصائص المظهرية morphological characteristics للبكتيريا من خلال صبغة غرام وذلك لقابليتها على الاصطباغ وعند مقارنة هذه النتائج مع النتائج القياسية جاءت متطابقة ومتوافقة مما يؤكد على نقاوة عزلة الاختبار Smutans

النتائج والمناقشة

**RESULTS AND
CONCLUSION**

النتائج والمناقشة

الصفات الزرعية:-

أوضحت النتائج نمو البكتريا *S. mutans* على وسط اكار الدم Blood agar وتظهر المستعمرات نامية فوق الوسط بمستوى اعلى من مستوى الوسط. وتظهر حولها هالات شفافة دلالة على ان هذه البكتريا محللة للدم وتحلل الدم فيها يكون من نوع α (تحلل جزئي للدم).

الصفات المجهرية:-

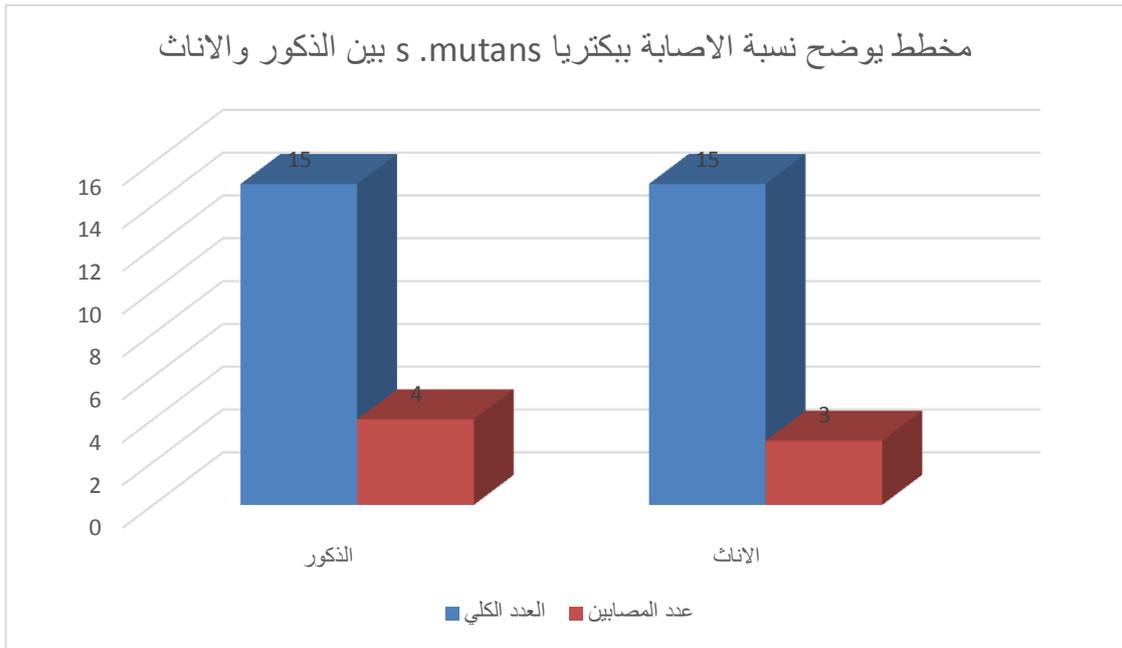
بعد تصبغ البكتريا بصبغة كرام يتم اجراء الفحص المجهرى للتأكد من نوع البكتريا حيث تظهر بكتريا *S. mutans* بشكل سلاسل مرتبة من كريات مستديرة وتأخذ اللون البنفسجي لأنها بكتريا موجبة لصبغة كرام.

جدول رقم (1) يبين مستوى الإصابة بين الذكور والاناث

الجنس	عدد المصابين
ذكر	4
انثى	3

من بين جميع العينات المفحوصة والتي عددها 30 عينة وجدت بكتريا s.mutans لدى سبعة عينات فقط دلالة على وجود البكتريا في فم سبعة اشخاص من العدد الكلي حيث وجد ان نسبة الإصابة لدى الذكور اعلى من نسبة الإصابة لدى الاناث وواقع (3:4)

وعلى الرغم من وجود البكتريا في فم الأشخاص المصابين الا انها لم تحدث ذلك الضرر المتوقع وليس هناك تسوس كبير في اسنان الأشخاص المجرى عليهم الفحص



وبالعودة للاختبارات الكيموحيوية فإن بكتريا S.mutans تصنف على انها بكتريا موجبة لاختبار اللاكتوز (مخمرة للاكتوز) وسالبة لاختباري الكاتليز والجيلاتين كما في الجدول التالي

نوع الاختبار	النتيجة
--------------	---------

مخمرة للاكتوز	تخمير اللاكتوز
غير محللة للجيلاتين	تحلل الجيلاتين
موجبة لاختبار الكاتليز	اختبار الكاتليز

شخصت العزلات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية باستخدام الطرق الروتينية في الفحوصات البايوكيميائية لهذا الغرض معتمدين على أساس الخصائص الزرعية cultural characteristics من خلال أشكال المستعمرات النامية وخصائصها ونموها على الأوساط الزراعية التفريقية وكذلك الخصائص المظهرية morphological characteristics للبكتيريا من خلال صبغة غرام وذلك لقابليتها على الاصطباغ وعند مقارنة هذه النتائج مع النتائج القياسية جاءت متطابقة ومتوافقة مما يؤكد على نقاوة عزلة الاختبار Smutans

المصادر

REFERENCES

المصادر

- **Touyz L., Amsel R. (2001).** Anticariogenic effects of black tea (camellia sinensis) in caries – prone rats. Quintessence – Int. 32(8): 647 – 50.
- **Costerton, J. W and Donlon, R.M..(2002).** Biofilm microbial life on surface.J.emer. infect. disease.8(9):881-890.
- Murray J.J. (1989).** The Prevention of dental Disease. 2nd ed Oxford medical publications.
- Javed M, (2013).**'transmission of streptococcus mutans from mother to child
- **Dental health and tooth fillings (Web M D)**
- Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F. (2010).** “Oral Microbiology ata Glance” Wiley Blackwell. Singapore, Hong Kong.