

형광 현미경법 및 효소결합 면역흡착법을 이용한 *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* 및 *Bacteroides asaccharolyticus*의 혈청학적 연구

서울대학교 치과대학¹ · 경희대학교 치과대학² · 숙명여자대학교 이공대학³ · 전남대학교 치과대학⁴

정종평¹ · 이진용² · 이영희³ · 정해원¹ · 정현주⁴

=Abstract=

Serological Study on the Cross-Reactivity of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides asaccharolyticus* by Indirect Immunofluorescence and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

C-P Chung¹, J-Y Lee², Y-H Lee³, H-W Chung¹ and H-J Chung⁴

College of Dentistry, Seoul National University¹, College of Dentistry, Kyung Hee University²,
College of Science, Sook-Myung Women's University³, College of Dentistry, Chun Nam National University⁴

Previous studies have been performed for the sero-identification of selected species of *Bacteroides* by immunofluorescence antibody techniques and enzyme-linked immunosorbent assay using species-specific rabbit antisera to *B. gingivalis*, *B. intermedius*, and *B. melaninogenicus*. However, these studies have not commented on the serological cross-reactivity between these 3 species of black-pigmented *Bacteroides*. For the cross-reactivity study, antisera to *B. gingivalis* ATCC 33277, *B. intermedius* ATCC 25261 and *B. asaccharolyticus* ATCC 25260 were raised from rabbits. Preliminary study for observing the cross-reactivity between these species was performed by indirect immunofluorescence technique. Immunoabsorption of the antisera was done with bacterial cells from the other species and the species-specificity of the antisera was conformed by the absence of reactivity with bacterial strains from the other species by indirect immunofluorescence technique and enzyme-linked immunosorbent assay. Three representative unabsorbed antisera cross-reacted strongly with cells from the other species. Especially, anti-*B. asaccharolyticus* ATCC 25260 antiserum showed a strong cross-reactivity with *B. gingivalis* ATCC 33277. After immunoabsorption of 3 representative antisera with the other species, the cross-reactivity was found only between *B. gingivalis* ATCC 33277 and *B. asaccharolyticus* ATCC 25260. Further study would be necessary to clarify the cross-reactivity between important oral black-pigmented *Bacteroides* from subgingival plaque or bacterial colonies for rapid identification.

서 론

구강내 혐기성 세균의 분리동정에 관한 연구가 급속한 발전을 이루면서 치주질환의 원인에 대한 세균학적 관점이 더욱 높아지게 되었다. 구강내 존재하는 혐기성 세균중 black-pigmented *Bacteroides*

*본 논문은 1986년도 한국과학재단 연구비에 의하여 이루어졌음.

는 치주질환의 심도와 정비례하고 성인성 및 급성 진행성 치주염의 치주낭내에서 높은 발혈빈도를 나타내고 있다^{1,10}. 이러한 black-pigmented *Bacteroides* 중 성인성 및 급성진행성 치주염과 가장 밀접한 관련이 있는 것은 *Bacteroides gingivalis*와 *B. intermedius*로 밝혀졌다^{6,10}. 이 두 균종에서 *B. gingivalis*는 동물실험에서 비장세포를 활성화시켜 과골세포의 골흡수 능력을 촉진시키며, 급성진행성으로 조직을 파괴하고 궤양 및 괴저를 일으키며

phlegmonous abscess를 야기시키는 것으로 나타났다^{1, 9, 14, 17, 20, 22}. 이러한 *B. gingivalis*는 pili와 협막 및 vesicle¹⁷⁾을 가지며 이 세균의 lipopolysaccharide는 mitogenicity가 있고 polyclonal B cell activation에 관여하며, interleukin 1생산을 촉진하는 것으로 알려지고 있다^{11, 17}. 또한 이 세균은 강력한 collagenase를 분비하여 collagen, azocoll 및 casein 등을 파괴하며 protease를 분비하는데, 이 protease는 IgA 및 IgG를 파괴하는 역할도 한다. 이 세균은 다형핵백혈구의 화학주성 능력 저지인자를 가지고 있으며 세균탐식 및 살균능력을 약화시키는 능력도 가지고 있다. 아울러 fibrinolysis를 일으키며 superoxide dismutase를 분비하기도 한다¹⁷. 또한 면역학적 연구를 통하여 급성진행성 치주염 및 성인성 치주염환자의 혈청내에서 높은 항체역가가 나타나는 것으로 확인되었다^{2, 8, 10}. *B. intermedius*는 급성 괴저성 케양성 치은염, 사춘기성 및 임신성 치은염^{16, 17}, 감염치수²¹, 치근단염^{7, 22}, 급성진행성 치주염 및 성인성 치주염^{16, 17}에서 높은 발현율을 보이며, 치주질환이 활동기에 있을때 *B. gingivalis*와 더불어 빈발하게 나타나고 있다¹⁰. 이 세균은 형태적으로는 *B. gingivalis*와 유사하나 감염시 국소적 케양을 일으키며 효소분비 및 생물학적 독성에 있어서 두 균주가 유사함을 보이고 있다^{9, 20}. 이러한 *B. intermedius*의 면역학적 연구결과 급성 괴저성 케양성 치은염 환자에서 높은 항체역가를 나타내고 있다⁸. 이들 두 균주와 유사한 asaccharolytic한 *Bacteroides*로서 *B. asaccharolyticus* 균주를 들 수 있다. 이 균주는 *B. gingivalis*와 동일하게 asaccharolytic하며, 생화학적으로 동일한 물질을 분비하나 지방산 대사의 최종산물로서 phenylacetic 산을 분비하지 않으며, 양의 적혈구 응집반응을 일으키지 않고 감염시 침윤성 케양을 보이지 않는다는 점이 *B. gingivalis*와 상이한 점이라 보겠다^{9, 21, 23}. 따라서 이러한 연구결과는 *B. gingivalis*, *B. intermedius*가 치주질환 진행에 가장 중요한 세균임을 시사하는 것으로, 이 두 세균의 치주낭내증가 및 감소가 치주질환의 조기진단, 예방 및 예후 예측에 중요한 인자가 된다는 점을 제시하고 있다. 이들 세균에 대한 분리·동정법은 생화학적 검사 및 지방산 대사 최종산물의 검사등을 통하여 이루어졌으나 시간, 경비등이 많이 소모되므로 보다 신속하고 용이한 방법의 개발이 요구되어 왔다. 최근 면역학적 연구방법의 발달로 이들 세균에 대한 복합 clone 항체, 단일 clone 항체생산과 이를 이용한 형광 현미경법 및 효소결합 면역흡착법에 의한 혈청학적 동정법이 개발되었다^{4, 5, 6, 10, 12}. 이같은 방법은 채취한 치

태내 세균을 직접 동정하는데 응용되거나 혐기성 상태에서 혈액 한천 배지에 증식된 균 집락을 직접 동정하는데 이용되고 있다. 그러나 이러한 연구방법은 항혈청을 이용하기 때문에 혈청학적으로 균주간의 교차반응이 있을 경우 균주들의 동정은 용이하지 않다. 최근까지의 연구보고서는 이들 균주간의 항원교차반응이 존재하지 않는다고 언급하고 있는 바^{4, 5, 12, 13} 본인은 이러한 문제를 형광현미경법과 효소결합면역흡착법을 이용하여 보다 세밀히 검토하고자 상기 3 균주간의 교차반응을 조사하고 이를 제거함으로써 치태 및 혈액 한천배지상의 균 집락을 보다 효과적으로 혈청학적 방법을 이용하여 동정하고자 하는데 연구목적을 두었다.

재료 및 방법

표준균주의 배양

B. gingivalis, *B. intermedius* 및 *B. asaccharolyticus*의 혈청학적 연구를 위하여 순수분리된 *B. gingivalis* ATCC 33277, *B. intermedius* ATCC 25261 및 *B. asaccharolyticus* ATCC 25260을 각각 5µg/ml hemin 및 2µg/ml menadione이 첨가된 brain heart infusion broth에 접종하여 37°C 혐기성 배양기 (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂, Coy Lab. Products, Ann Arbor, MI, U.S.A.)에 48~72시간 배양시킨 후 성장정지기의 세균배양액을 각각 500ml씩 취하여 원심분리 (16,000×g, 20min)시켜 세균집합층을 취한 후 인산 완충용액 (PBS; pH7.2)으로 3회 세척하였다. 세척된 3가지 표준균주는 0.5% 완충 formalin 용액에 16~18시간 상온에서 고정시킨 후 다시 PBS로 3회 세척하여 동일 PBS로 희석하여 4°C 냉장고에 사용시까지 보관하였다.

항혈청 생산

항혈청 생산에 필요한 세균면역 감작을 위하여 순수배양 및 고정과정을 거친 3가지 표준균주를 각각 10mg/ml (습량)씩 여과 멸균된 PBS에 희석시킨 후, 중량 2kg 가토의 정맥에 면역량을 50µl로부터 200µl까지 단계적으로 증가시키면서 2일 간격으로 주사하여 2주간 면역감작시켰다. 1주 휴식 후 재차 1주일간 증폭 면역감작을 실시한 다음 가토혈청을 채취하여 예비 혈청항체 역가검사를 형광현미경법을 이용하여 높은 역가를 확인하고나서 1주후에 심장 천공법으로 혈액을 채취한 다음 혈청을 분리·보관하였다.

형광 현미경법을 이용한 혈청학 연구

Table 1. Titration of homologous and heterologous antigens against representative antisera which was unabsorbed (by indirect immunofluorescence)

Antigens	Titer of given antigen when titrated against antiserum raised against		
	<i>B. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	<i>B. intermedius</i> ATCC 25261
<i>B. gingivalis</i> ATCC 33277	1280	320	320
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	320	2560	1280
<i>B. intermedius</i> ATCC 25261	640	640	2560

ATCC: American type culture collection

수거된 3 종류의 항혈청은 각 세균각의 교차 반응 유무를 확인하기 위하여 형광현미경법을 이용하여 검사하였다. 즉, 1×10^6 cells/ml로 희석된 각각의 표준균주 20 μ l를 slide glass 상에 도말, 고정시킨 후 4% bovine serum albumin이 함유된 PBS로 2배 단계희석된 각 균주 항혈청 20 μ l를 도말부위에 적하한 다음 37°C, 가슴배양기내에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 동일 PBS에 30분간 담근 후 여분의 PBS를 제거하고 fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel Lab., Cochranville, P.A., U.S.A.; F/P=3.1) 20 μ l (1:50희석)를 37°C, 가슴 배양기내에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 세척하고 90% glycerin 용액으로 고정하였다. 고정된 표본은 Olympus BH-2 (Olympus Inc. Co., Osaka, Japan) 형광현미경을 사용하여 관찰하였다. 이때 HBO 100 W/2 mercury lamp와 BP 405 exciting filter, dichroic 500 interference filter, L 435 barrier filter를 사용하여 관찰하였다. 관찰시 세균 외막의 형광물질이 확연히 구분될때에 양성 1로 하여 각각 2, 3으로 강도를 구분, 관찰하였다.

면역흡착법

형광 현미경 관찰을 통하여 각 항 혈청간의 교차 반응 유무를 관찰한 후 이 교차반응을 제거시키기 위하여 2ml의 항 *B. gingivalis* 혈청에는 *B. intermedius* 및 *B. asaccharolyticus* 균주 200mg (습량)를 첨가하고 항 *B. intermedius* 혈청에는 *B. gingivalis* 및 *B. asaccharolyticus*를, 항 *B. asaccharolyticus* 혈청에는 *B. intermedius*, *B. gingivalis*를 각각 동일 방법으로 첨가하여 37°C 배양기에서 15rpm의 속도로 1시간 혼합시킨 후 4°C 냉장고에 12시간 보관하여 반응시켰다. 이렇게 반응된 혈청은 1시간 원심분리 (16,000 \times g)시켜 상층액을 취한 후 예비실험과 동일하게 형광 현미경법을 이용하여 각

균주간의 교차반응 유무를 관찰하였다.

효소 결합 면역측정법을 이용한 혈청학 연구

항 *B. gingivalis* 혈청, 항 *B. asaccharolyticus* 혈청 및 항 *B. intermedius* 혈청에 대한 각 균주의 교차반응 유무와 항체역가를 측정하기 위하여 *B. gingivalis* ATCC 33277, *B. intermedius* ATCC 25261 및 *B. asaccharolyticus* ATCC 25260을 각각 0.5% 완충 formalin으로 고정한 다음 PBS로 세척한 후에 이를 0.02% NaN_3 가 포함된 0.1M Na_2CO_3 완충액 (pH 9.6)으로 희석시켜 세균 농도를 분광계로 580nm에서 optical density 0.3이 되도록 조정된 후 polystyrene microtiter plate (Dynatech Lab. Inc., Alexandria, V.A., U.S.A.)에 200 μ l씩을 각각 분주한 후 이를 37°C 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 다음 4°C 냉장고에 사용시까지 보관하였다. 보관된 polystyrene microtiter plate를 0.05% Tween 20 (Sigma Chem. Co., St. Louis, M.O., U.S.A.) 이 포함된 0.9% NaCl (pH 7.4) 용액 (세척완충용액)으로 세척한 후 항혈청과 반응시켰다. 사용된 항 혈청은 0.05% Tween 20 및 0.02% NaN_3 가 든 PBS (항체 완충용액)로 1:640부터 2배 단계 희석시키고 희석된 각기 다른 3가지 항 혈청을 protocol에 따라 각 well에 200 μ l씩 분주하고 37°C 배양기에서 2시간 반응시켰다. 반응된 각 well은 세척완충용액으로 세척하고 나서 항체 완충용액으로 희석시킨 (1:1,000) alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Cappel, Cooper Biochemical Inc., Malvern, P.A., U.S.A.) 100 μ l를 각 well에 분주하고 2시간동안 37°C에서 반응시켰다. 반응된 각 well을 세척완충용액으로 세척하고 발색반응을 위하여 *p*-nitrophenyl phosphate (1mg/1ml in 0.05M Na_2CO_3 , pH 9.8; Sigma Chem. Co., St. Louis, M.O., U.S.A.) 100 μ l를 첨가하여 반응시킨 후 반응을 저지시키기 위하여 30분 이내에 1N NaOH 용

Table 2. Titration of antigens prepared from *B. gingivalis*, *B. intermedius* and *B. asaccharolyticus* with absorbed sera raised against the type strains of these subspecies

Antigens	Titer of given antigen when titrated against antiserum raised against		
	<i>B. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	<i>B. intermedius</i> ATCC 25261
<i>B. gingivalis</i> ATCC 33277	1280	320	—
<i>B. asaccharolyticus</i> ATCC 25260	—	640	—
<i>B. intermedius</i> ATCC 25261	—	160	2560

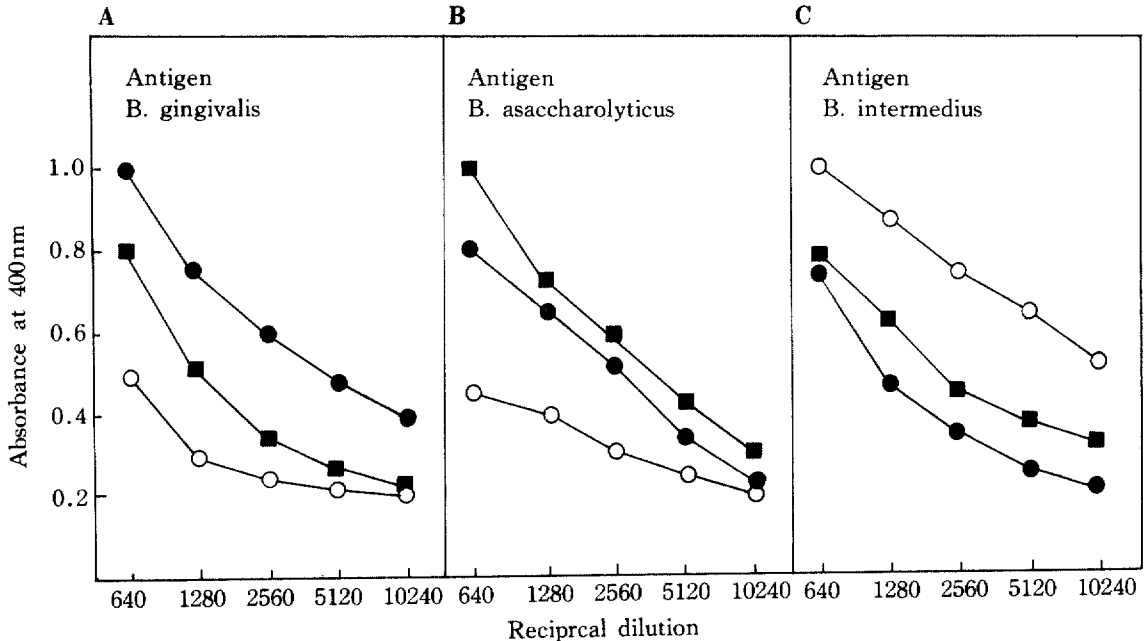


Fig. 1. Titration of antigens prepared from *B. gingivalis*, *B. intermedius* and *B. asaccharolyticus* with absorbed sera raised against the type strains of these subspecies. The reactivity was measured by ELISA. Symbols; ●, anti-*B. gingivalis* antiserum, ○, anti-*B. intermedius* antiserum, ■, anti-*B. asaccharolyticus*.

액 50 μ l를 분주하고 400 nm에서 분광측정 ELISA reader (Dynatech Lab. Inc., Alexandria, V.A., U.S.A.)로 측정하였다.

결 과

가토로부터 얻은 항 *B. gingivalis* 혈청, 항 *B. intermedius* 혈청 및 항 *B. asaccharolyticus* 혈청을 자기 다른 2 종류의 *Bacteroides* 균주에 면역 반응을 시켜 간접 형광현미경법을 이용하여 관찰한 결과 항 *B. gingivalis* 혈청은 *B. asaccharolyticus* 및 *B. intermedius*와 중등도의 교차반응이 나타났으며, 항 *B. asaccharolyticus* 혈청은 *B. gingivalis* 및 *B. intermedius*에 각각 중등도의 교차반응을 나타내고 있

고 항 *B. intermedius* 혈청은 *B. gingivalis* 및 *B. intermedius*에 대해 중등도의 교차반응을 보였다 (Table 1). 이러한 항 *B. gingivalis* 혈청에 대한 다른 두 균주의 교차반응을 제거하기 위하여 두 균주를 동혈청에 넣어 흡착반응을 시킨 결과 두 균주에 대한 교차반응은 나타나지 않았다. 같은 방법으로 항 *B. intermedius* 혈청으로 다른 두 균주를 흡착반응시킨 결과 이 두 균주에 대한 교차반응은 나타나지 않았다. 그러나 항 *B. asaccharolyticus* 혈청에 다른 두 균주를 흡착반응시켰으나 이 *B. gingivalis* 및 *B. intermedius* 균주에 대하여 중등도의 교차반응이 지속적으로 나타나고 있었다 (Table 2). 흡착반응을 시킨 3가지 항 혈청을 다시 효소결합 면역흡착법을 이용하여 조사한 결과 항 *B. intermedius* 혈

청만이 *B. gingivalis* 균주 및 *B. asaccharolyticus* 균주에 대하여 교차반응을 보이지 않을 뿐 항 *B. gingivalis*와 항 *B. asaccharolyticus* 혈청은 각각 *B. asaccharolyticus* 및 *B. gingivalis*에 대하여 교차반응을 보이고 있다(Fig. 1. a, b, c). 따라서 *B. intermedius* 균주는 *B. gingivalis* 혹은 *B. asaccharolyticus*에 대한 공통항원을 가지고 있지 않음이 판명되었으나 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*는 서로가 혈청학적으로 공통항원을 가지고 있음을 알게 되었다(Fig. 1. a, b, c).

총괄 및 고안

Black-pigmented *Bacteroides*가 여러 질환의 중요 원인균으로서 등장하면서 이들 균주의 혈청형 및 생물형 결정과 더불어 보다 간편한 방법으로 이들 균주를 동정하기 위한 연구가 진행되어 왔다. 이 중의 한 방법으로 각 균주간의 혈청형의 차이에 따르는 특성을 이용하여 이들 균주간을 구별하는 연구가 최근에 발전되고 있다^{4, 5, 10, 11}.

Reed(1980) 등은 전기영동법을 이용하여 초음파 파절시킨 *Bacteroides* 균주항원의 교차반응 검사에서 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*간에는 교차반응이 없다고 보고하고 있다¹⁰. Poxton(1979) 등은 혈청학적 연구를 통하여 *B. intermedius*와 *B. asaccharolyticus*간의 교차반응은 나타나지 않는다고 보고하였으며¹¹, Dzink(1983)등과 Ebersole(1984) 등도 이들 두 균주간에는 교차반응이 없는 것으로 보고하고 있다^{4, 5, 6}. 본 실험의 결과를 분석하면 이 두 균주간에는 중등도의 교차반응이 나타나고 있음을 알 수 있다(Table 1).

본 논문에서의 이러한 교차반응결과는 사용된 균주의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다고 사료되는데 Gmur(1983) 등의 연구결과에서 보여 주듯이 같은 *B. intermedius* 균주라도 분리균주가 다름에 따라 서로 다른 혈청형을 보임으로써 이중 항원성을 가지고 있음을 시사하고 있다⁶. 또한 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*는 생물형은 동일하나 단지 *B. gingivalis*가 trypsin 유사물질과 phenylacetic acid를 분비하는데 반해 *B. asaccharolyticus*는 분비하지 않는다는 점과 DNA homology가 다를 뿐이다^{17, 21, 22}. 따라서 이러한 관점에서 볼 때 두 균주는 생물형상의 차이는 아주 미미하다는 점을 시사하는 것이다. 따라서 두 균주간의 혈청형 차이에 대한 실험결과도 역시 두 균주간에 교차반응이 중등도로 나타나고 있으며(Table 1), 이들 두 균주에 대한 항 혈청을 각기 다른 균주로 흡착반응을 시킨

결과 이러한 교차반응이 약간 약화되긴 하였어도 나타나고 있음을 알 수 있다²⁰.

그러나 혈청은 항 *B. intermedius* *B. gingivalis* 및 *B. asaccharolyticus* 균주로 흡착반응 시킨 결과 이러한 교차반응이 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 1. a, b, c). 이러한 결과로 미루어 *B. gingivalis* 및 *B. intermedius*간에는 미약한 교차반응이 나타나고, 이는 공통항원이 약간 존재함을 시사하는 것으로, 이를 제거하는 데는 균주흡착 반응으로도 충분히 좋은 결과를 기대할 수 있으나 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*간에는 균주 흡착반응으로도 이러한 교차반응이 제거되지 못할 정도의 공통항원이 존재함을 알게 된다. 이러한 연구 결과는 구강내 black-pigmented *Bacteroides* 중 성인성 치주염, 급성 진행성 치주염, 급성 괴저성 궤양성 치은염 및 사춘기성 치은염과 직접 관련이 있는 *B. gingivalis*와 *B. intermedius* 두 균주의 혈청학적 연구에 따른 항 혈청을 이용한 이들 두 균주의 조기 감별 동정에 있어서는 별다른 어려움이 없음을 말해주고 있으나 *B. gingivalis*와 *B. asaccharolyticus*간의 혈청학적 감별 동정에는 공통항원에 따른 문제점이 있음을 예상할 수 있기 때문에 이는 *B. asaccharolyticus*가 비록 구강에 존재하지 않는 *asaccharolytic*한 *Bacteroides*이기는 하지만 간혹 구강내 치주낭 및 치근단에 나타난다는 보고²¹가 있는 바 먼저 구강내에 나타나는 *B. asaccharolyticus*의 발현빈도를 조사한 후 이에 따른 *B. gingivalis*의 혈청형 동정법이 보다 완전하게 이루어져야 되리라 생각된다. 또한 항 혈청을 가토로부터 얻는 과정에서 세균의 면역감작을 종래에는 세균전체를 이용하여 왔으나 협막 혹은 외막을 순수분리하여 이에 대한 항 혈청을 유도한다면 보다 특이한 세균특이성 항혈청이 얻어질 것이며 이를 이용한 혈청형 분류와 감별 동정에 이용한다면 종래의 교차반응을 극복할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

구강내 혐기성세균중 성인성 및 급성진행성 치주염의 가장 중요한 독성 균주인 *B. gingivalis* ATCC 33277 및 *B. intermedius* ATCC 25261와 *B. gingivalis* 유사균주인 *B. asaccharolyticus* ATCC 25260 균주간의 혈청학적 교차반응 유무를 비교 관찰하고자 상기 3균주를 가토에 면역감작시켜 항 혈청을 얻은 후 형광현미경 및 효소 결합 면역흡착법을 이용하여 혈청학적으로 3균주간의 교차반응 유무를 관찰하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역감작으로 가토에서 얻은 3가지 종류의 항 혈청은 형광 현미경법을 이용한 타균주간의 교차반응 검사에서 모두 양성반응을 나타냈다.

2. 3 종류의 항 혈청을 자기 다른 두 균주로 면역흡착 반응을 시킨 후 효소결합 면역흡착법 및 형광 현미경법으로 교차반응 유무를 관찰한 결과 항 *B. asaccharolyticus* 항체만이 특이하게 *B. gingivalis* 및 *B. intermedius*에 대하여 교차반응을 나타내고 있었고 다른 두 항 혈청은 자가 균주에 대하여만이 높은 항체 반응을 나타내고 있으며, 타 균주와의 교차반응을 보이지 않았다.

상기와 같은 결과는 면역감작만으로 얻은 3가지 항 혈청간에는 교차반응이 나타날 수 있고 면역흡착법을 이용할 경우 항 *B. asaccharolyticus* 혈청을 제외한 다른 항 혈청은 타균주에 대하여 교차반응을 보이지 않는다는 것을 알 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Bom-Van Noorloos AA, Schipper CA, van Steenberg TJM, De Graaff J and Burger E H: *Bacteroides gingivalis* activates mouse spleen cells to produce a factor that stimulates resorptive activity of osteoclasts *in vitro*. *J. Periodontal Res.*, **21**:440-444, 1986.
- 2) Chung CP and Lee YH: The proportion, antibiotic susceptibility and specific antibodies to *Bacteroides gingivalis* isolated from subgingival plaque of Korean rapidly progressive periodontitis. *Kor. J. Immunol.*, **7**:65-75, 1985.
- 3) Chung CP, Nisengard RJ, Slots J and Genco RJ: Bacterial IgG and IgM antibody titers in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J. Periodontol.*, **54**:557-562, 1983.
- 4) Dzink JL, Socransky SS, Ebersole JL and Frey DE: ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented *Bacteroides* isolated from periodontal pockets. *J. Periodontal Res.*, **18**:369-374, 1983.
- 5) Ebersole JL, Frey DE, Taubman MA, Smith DJ, Socransky SS and Tanner ACR: Serological identification of oral *Bacteroides* spp. by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **19**:639-644, 1984.
- 6) Gmur R and Guggenheim B: Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. *Infect. Im-*

mun., **42**:459-470, 1983.

- 7) Haapasalo M, Ranta H, Ranta K and Shah H : Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infect. Immun.*, **53**: 149-153, 1986.
- 8) Martin SA, Falkler WA, Suzuki JB, Hawley CE and Mackler BF: Local and systemic immunoglobulins reactive to *Bacteroides gingivalis* in rapidly progressive and adult periodontitis. *J. Periodontal Res.*, **21**:351-364, 1986.
- 9) Mayrand D, McBride BC, Edwards T and Jensen S: Characterization of *Bacteroides asaccharolyticus* and *B. melaninogenicus* oral isolates. *Can. J. Microbiol.*, **26**:1178-1183, 1980.
- 10) Mouton C, Hammond PG, Slots J, Reed MJ and Genco RJ: Identification of *Bacteroides gingivalis* by fluorescent antibody staining. *Ann. Microbiol (Inst. Pasteur)*, **132B** : 69-83, 1981.
- 11) Okuda K, Fukumoto Y and Takazoe I: Structure of lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *Bull. Tokyo dent. Coll.*, **26**:197-203, 1985.
- 12) Poxton IR: Serological identification of *Bacteroides* species by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Pathol.*, **32**: 294 - 298, 1979.
- 13) Reed M, Slots R, Mouton C and Genco RJ: Antigenic studies of oral and nonoral black-pigmented *Bacteroides* strains. *Infect. Immun.*, **29**:564-579, 1980.
- 14) Roeterink CH, van Steenberg TJM, De Jong WFB and De Graaff J: Histopathological effects in the palate of the rat induced by injection with different black-pigmented *Bacteroides* strains. *J. Periodontal Res.*, **19**: 292-302, 1984.
- 15) Simonson LG, Merrell BR, Rouse RF and Shklair IL: Production and characterization of monoclonal antibodies to *Bacteroides gingivalis*. *J. Dent. Res.*, **65**:95-97, 1986.
- 16) Slots J: Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. In: Host-parasite interactions in periodontal disease. RJ Genco and SE Mergenhagen (eds), Washington DC, American Society for Microbiology, pp. 27-45, 1982.

- 17) Slots J and Genco RJ: Microbial pathogenicity. Black-pigmented *Bacteroides* species, *C-
apnocytophaga* species, and *Actinobacillus ac-
tinomycetemcomitans* in human periodontal di-
sease: virulence factors in colonization, sur-
vival and tissue destruction. *J. Dent. Res.*, **63**:
412-421, 1984.
- 19) Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Vis-
conti RA and Socransky SS: A study of the
bacteria associated with advancing periodon-
titis in man. *J. Clin. Periodontol.*, **6**: 278-307,
1979.
- 20) van Steenberghe TJM, Kastelein P, Touw JJ
A and De Graaff J: Virulence of black-pig-
mented *Bacteroides* strains from periodontal
pockets and other sites in experimentally in-
duced skin lesions in mice. *J. Periodontal
Res.*, **17**: 41-49, 1982.
- 21) van Steenberghe TJM, van Winkelhoff AJ,
Mayrand D, Grenier D and De Graaff J: *Ba-
cteroides endodontalis* sp. nov., an asaccharo-
lytic black-pigmented *Bacteroides* species from
infected dental root canals. *Int. J. Syst.
Bacteriol.*, **34**: 118-120, 1984.
- 22) van Winkelhoff AJ, Carlee AW and De Gra-
aff J: *Bacteroides endodontalis* and other bla-
ck-pigmented *Bacteroides* species in onto-
genic abscesses. *Infect. Immun.*, **49**: 494 - 497,
1985.
- 23) Woo DDL, Holt SC and Leadbetter ER: Ul-
trastructure of *Bacteroides* species: *Bacteroi-
des asaccharolyticus*, *Bacteroides fragilis*, *Ba-
cteroides melaninogenicus* subspecies *melanino-
genicus* and *B. melaninogenicus* subspecies *in-
termedius*. *J. Infect. Dis.*, **139**: 534-546, 1979.
- 24) Yamamoto A, Takahashi M and Takamori K:
Serogrouping of outer membrane surface an-
tigen of black-pigmented *Bacteroides* by the
immunodiffusion test. *Bull. Tokyo dent. Coll.*,
23: 135-143, 1982.
- 25) Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P and Gen-
co RJ: Rapid identification of periodontal pa-
thogens in subgingival dental plaque: compa-
rison of indirect immunofluorescence micros-
copy with bacterial culture for detection of
Bacteroides gingivalis. *J. Periodontol.*, **56** (Sp-
ecial issue): 32-40, 1985.