

التحري عن كفاءة عدد من الأوساط الناقلة وأوساط عزل وتنمية جراثيم *Treponema* الغم المعزولة من إصابات ما حول الأسنان

سمية عدنان صالح محمد أميرة محمود محمد الراوي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام ٢٧ / ١٢ / ٢٠١٠ ؛ تاريخ القبول ٢١ / ٢ / ٢٠١١)

الملخص

تم التحري عن كفاءة ثلاثة أنواع من الأوساط الناقلة (Normal و Tris-HCl— EDTA fluid) في نقل عينات جراثيم *Treponema* الفم وإمكانية اعتماد خمسة أوساط غذائية (Reduced transport media و saline Supplumented pleupneumolike organism و New oral spirochetes) و Thioglycolate medium و Pepton- yeast extract- glucose و Trypton- yeast extract- و glucose- volatile fatty acid-serum medium و أنواع من الأوساط الزرعية الصلبة (glucose- volatile fatty acid-serum medium و Thioglycolate-BHI agar) و Trypton- yeast extract- glucose- volatile fatty acid-serum و agar) لأغراض العزل الأولي وتنمية هذه الجراثيم والتوصل إلى أهم الإضافات اللازمة لدعم نموها. وقد تبين كفاءة الأنواع الثلاثة من الأوساط الناقلة في نقل وإدامة حيوية جراثيم *Treponema* الفم لحين إيصالها إلى المختبر وزرعها، كما تبين كفاءة أنواع أوساط العزل الأولي وأوساط التنمية الصلبة في دعم نمو هذه الجراثيم بعد تزويدها بعوامل النمو اللازمة لاغناء الوسط الزرعى إذ أمكن توفير الظروف اللاهوائية المثلى للنمو بإضافة المواد المختزلة (Sodium thioglycolate و L-cystein) إلى الأوساط الزرعية مع التحضين في جار لا هوائي، كذلك تزويد العوامل الضرورية للنمو من الاحماض الدهنية طويلة السلسلة بإضافة Isobutyric acid و المصل ، وأثبتنا قدرة ثلاثة أنواع من المصل Rabitt serum ، Fetal calf serum و Fetal bovin serum في دعم الأوساط الزرعية، واعتماد طريقة العزل الانتخابي لجراثيم *Treponema* بإضافة المضاد الحيوي Rifampcin . فضلا عن ذلك لوحظ وجود شكلين لنمو هذه الجراثيم في الأوساط السائلة هما التعكر بعد يومين من التحضين وتكوين الراسب ذي مظهر اطلاقا الحرير بعد أربعة أيام من التحضين كما لوحظ تباين في أشكال مستعمراتها على الأوساط الصلبة.

Detection of the Efficacy of some Transport, Isolation and Culture Media for Oral Treponema Isolated from Periodontitis

Summaya A. Muhammad

Amera M. Al-Rawi

*Department of Biology
College of Science
Mosul University*

ABSTRACT

The ability of three types of transport media (Tris-HCl— EDTA fluid , Normal saline and Reduced transport media) to transfer oral treponema samples was investigated , in addition to the capability of relying five types of nutritional media (New oral spirochetes, Supplumented pleupneumolike organism, Thioglycolate medium, Pepton- yeast extract- glucose, and Trypton- yeast extract- glucose- volatile fatty acid-serum medium) and two types of solidified culture media (Thioglycolate-BHI agar and Trypton- yeast extract- glucose- volatile fatty acid-serum agar) for the primary isolation and subculturing of these organisms reaching the most necessary supplements required to support the growth of these organisms. The efficacy of the three types of transport media in transport and maintenance of the vaibility of these organisms was shown, also the efficacy of primary isolation and subculturing media to support the organisms' growth was proved after supplementing these media with the necessary growth elements. Hence it was possible to provide the optimal anaerobic conditions for the growth by the addition of reducing agents (Sodium thioglycolate and L-cystein) to the culture media and incubation in anaerobic jar, furthermore, introducing the necessary elements of long chain fatty acid by the addition of isobutyric acid and serum, and we confirm the ability of three types of serum (Rabbit serum, Fetal calf serum and Fetal bovin serum) to support the culture media. We had showing possibility of depending upon the selection isolation method by the addition the antibiotic rifampicin. Moreover, it was observed two forms of growth of these organisms: the turbidity after two days of inocubation and the sediment form with the shot silk after four days of incubation, and the variation in colonies form on the solid media was also clear.

Keywords: Cultivation of oral Treponema, Nutritional requirements of oral Treponema .

المقدمة

تتواجد أنواع Treponema الفم بصورة رئيسة بوصفها فلورا مايكروبية وبإعداد قليلة في تجويف اللثة، مرتبطة مباشرة مع الخلايا الطلائية لجيوب حول الأسنان ويزداد عددها حال حدوث التهاب اللثة الشديد Severe gingivitis، التهاب ما حول الأسنان المتفقم Aggressive periodontitis، وإصابات التهاب اللثة المتقرحة Ulcerative gingivitis، وهي من المسببات الشائعة لإصابات ما حول الأسنان

المزمنة Chronic periodontitis 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 Periodontal tissues (Kecis *et al.*, 2008 ; Edwards *et al.*, 2005).

تتطلب تنمية أنواع Treponema اللاهوائية صبراً ومعرفة الاحتياجات التغذوية لهذه الكائنات لتوفير وسط أغنائي يساعد في نموها، فبعضها يحتاج إضافة المصل. وأن كل سلالات Treponema الفم تحتاج الى إضافة (TTP) Thiamin pyrophosphate لدعم نموها وتوصل الباحثون إلى أهمية احتواء الوسط الزراعي على الأحماض الأمينية Histidin، Serine، Cysteine، Cystenyl-glysin (Cys-Gly)، Methionine و Glutathione (Tucci and Martin, 2007 ; Fenno *et al.*, 2000).

الاعتبار الآخر المهم لتنمية هذه الجراثيم هو استخدام وسط لا هوائي مختزل جيداً Well – reduced anaerobic media اذ يحتاج عزل Treponema اللاهوائية حجرة أو جار لاهوائي و أن مزيج الغازات المستخدم يمكن أن يوفر من Gas pak أو قناني الغاز Gas tank، في كثير من المختبرات تستخدم أنظمة زرع مكونة من أوساط مختزلة في حاضنات لاهوائية يستمر فيها سحب الأوكسجين وتزويد النيتروجين أو ثاني أوكسيد الكربون إذ أن أفضل نمو يكون عندما لا تزيد نسبة الأوكسجين عن ٠,١% في الحجرة اللاهوائية (Prescott *et al.*, 2005 ; McDowell *et al.*, 2005).

فصل الباحثون ثلاث طرائق معتمدة في عزل جراثيم Treponema من الفم أو من مصادر أخرى عن باقي الجراثيم، تشمل هذه الطرائق: - طريقة الحُفر Wells method (و تعتمد على قدرة جراثيم Treponema على الهجرة خلال الأكار بعيداً عن الجراثيم الأخرى في حفرة تلقيح العينة)، طريقة المرشحات Membrane filters method (تعتمد على قدرة جراثيم Treponema في اختراق الثقوب الدقيقة (٠,٢٢ مايكرون) للمرشحات والتي لا تمرر الجراثيم الأخرى)، استخدام وسط زرع اختياري لجراثيم Treponema حاوٍ على مضادات حيوية، وبعد العزل الانتخابي لعزلات Treponema تنمى على أوساط صلبة للحصول على مستعمراتها وعزلها بمزارع نقية لدراسة خصائصها وذلك بإضافة ٠,٧% من الاكار لنفس الوسط السائل الخاص بتنمية هذه الجراثيم، وان الحصول على مستعمرات Treponema قد يكون صعباً ويحتاج صبراً Patience (Starr *et al.*, 1981).

وبسبب كون جراثيم Treponema الفم احد أهم الممرضات الحقيقية لأنسجة ما حول الأسنان بسبب نشاطها الأنزيمي المحلل لهذه الأنسجة والذي قد يؤدي إلى فقدان السن أو انتشار هذه الممرضات عن طريق الدم لأعضاء أخرى في الجسم وبسبب قلة التركيز على هذه الجراثيم كونها لاهوائية صعبة الإرضاء والتنمية فقد عنيت الدراسة الحالية لان تكون أول دراسة محلية تبحث في إيجاد بعض الأوساط الناقلة والأوساط الزرعية الكفوءة في نقل وتنمية هذه الجراثيم المهمة طبياً للإنسان.

المواد وطرائق العمل

العينات Samples

- جمعت العينات من جيوب ما حول الأسنان من المرضى المصابين بالتهاب ما حول الأسنان Periodontitis المراجعين إلى المستشفى التعليمي لكلية طب الأسنان في جامعة الموصل والمركز التخصصي لطب الأسنان / الساحل الأيمن بإتباع الخطوات المذكورة في (Kasuga *et al.*, 2000) والمتضمنة :
- عزل منطقة الجيب باستخدام القطن Cotton roll .
 - إزالة الصفيحة الجرثومية فوق اللثة Supragingival plaque باستخدام القطن Cotton pellet .
 - قياس عمق الجيب (PD) Pocket depth باستخدام المسبار Periodontal probe .
 - إدخال الخيط الخاص Paper point لداخل الجيب إلى قاعدته وتركه لمدة دقيقة واحدة ثم رفعه ووضعه في أنبوبة الاختبار الحاوية على ٠,٥ سم³ من الوسط الناقل باستخدام ملقط معقم. أحكم غلق الأنابيب ونقلت إلى المختبر لإجراء الاختبارات البكتريولوجية.

Transport media

الوسط الناقل

تم استخدام احد المحاليل التالية كسائل ناقل للعينات :

١. المحلول Tris-HCl— EDTA (T-E) Fluid :

حضر كما أشار إليه (Desvarieux *et al.*, 2005) بتركيز املي مول من Ethylen DTA (diamine tetra acetic acid) و ١٠ ملي مول من Tris-HCl /لتر.

٢. المحلول الفسلجي Normal saline :

أستخدم المحلول الفسلجي لنقل العينات كما أشار إليه (Willis *et al.*, 1999) .

٣. الوسط الناقل المختزل Reduced transport media :

حضر كما ذكر في (Umeda *et al.*, 1990) : ٣٧ غرام Brain heart infusion ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، التتر Distilled water .

بعد تحضير الوسط الناقل عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٢ وعقم بالموصدة بدرجة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة ثم وزعت في أنابيب الاختبار المعدة لجمع العينات .

Culture media

الأوساط الزرعية

أوساط العزل الأولي:

حضرت خمسة أنواع من الأوساط الغذائية لأغراض العزل الأولي لجراثيم Treponema تضمنت :

١. وسط **New oral spirochetes (NOS)** المحور:

حضر حسب ما ذكره (Uitto *et al.*, 1995) من المكونات الآتية: ١٢,٥ غرام Brain heart infusion ، ١٠,٠ غرام Trypticase ، ٢,٥ غرام Yeast extract ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، ١,٠ غرام L-Cysteine ، ٠,٢٥ غرام L-Aspartate ، ٢,٠ غرام Glucose ، ٠,٠٠٦ غرام Ascorbic acid ، ٢,٠ غرام Sodium bicarbonate ، ١ لتر Distilled water .

٢. وسط **Supplemented pleupneumolike organism (PPLO)** المحور:

حضر حسب ما جاء في (Difco manual,1998) من المكونات الآتية: ٥٠,٠ غرام Beef extract ، ١٠,٠ غرام Pepton ، ٥,٠ غرام NaC 1 ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، ٢,٠ غرام Sodium bicarbonate ، ٠,٠١ غرام Crystal violet ، ١ لتر Distilled water. بعد تحضير الوسط زود بالمكونات الآتية لجعله مدعماً لنمو جراثيم *Treponema* كما وصفه (Starr *et al.*,1981): ١,٠ غرام Glucose ، ١,٠ غرام L-Cysteine ، ٠,٤ غرام Nicotinamide ، ٠,٠٠٦ غرام Ascorbic acid .

٣. وسط **Thioglycolate medium**

حضر حسب توصيات شركة MERAEEK المجهزة بإذابة ٣٠ غرام من الوسط في لتر ماء مقطر. ويتكون هذا الوسط من: ١٥,٠ غرام Pepton ، ٥,٠ غرام Yeast extract ، ٥,٥ غرام D+ Glucose ، ٠,٥ غرام L+ Cysteine ، ٢,٥ غرام NaCl ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، ٠,٠٠١ غرام Resazurin sodium ، ٠,٧٥ غرام Agar-agar .

٤. وسط **Pepton- yeast extract- glucose (PYG)** المحور:

حضر من المكونات الآتية حسب ما جاء في (Lennett *et al.*,1985): ٢٠,٠ غرام Pepton ، ٠,٠ غرام Yeast extract ، ٠,٥ غرام L-Cysteine ، ١٠,٠ غرام Glucose ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، ٢,٠ غرام Sodium bicarbonat ، ٤٠,٠ سم^٣ Salts solution ، ٩٦٠ سم^٣ Distilled water .

حضر محلول الأملاح Salts solution كالآتي: ٠,٢ غرام CaCl₂ ، ٠,٢ غرام MgSO₄ ، ١,٠ غرام K₂HPO₄ ، ١,٠ غرام KH₂PO₄ ، مزج CaCl₂ و MgSO₄ في ٣٠٠ سم^٣ ماء مقطر وبعد إذابتها أضيف ٥٠٠ سم^٣ ماء مقطر ثم أضيف باقي الأملاح مع التحريك المستمر لإذابتها، أضيف ٢٠٠ سم^٣ ماء مقطر وحفظ المحلول في الثلاجة.

٥. وسط **Trypton- yeast extract- glucose- volatile fatty acid- serum (TYGVS)**

medium المحور:

حضر بالاعتماد على ما جاء في (Starr *et al.*, 1981) من المكونات الآتية : ٣٠,٠ غرام Trypton ، ٥,٠ غرام Yeast extract ، ٥,٠ غرام Glucose ، ٢,٥ غرام NaCL ، ٠,٧٥ غرام L-Cysteine ، ٠,٥ غرام Sodium thioglycolate ، ٢,٠ غرام Sodium bicarbonate ، ١ لتر Distilled water . تم تحويل وسطي NOS و PPLO بإضافة الـ Ascorbic acid بديلا عن TTP (Wyss, 1992) وتحويل الأوساط PPLO, PYG, TYGVS بإضافة ٠,٥ غرام من مادة Sodium thioglycolate لاختزال الأوكسجين من الوسط وإضافة مادة Sodium bicarbonate بنسبة ٢,٠ غرام/ لتر (Hardy and Munro, 1966).

الأوساط الزرعية الخاصة بتنمية جراثيم *Treponema* :

حضر نوعان من الأوساط الصلبة لملاحظة مستعمرات الجرثومة حسب ما ورد في (Starr *et al.*, 1981) :

١. وسط Thioglycolate-BHI agar :

حضر من مكوناته بالنسب الآتية: Thioglycolate medium (3 Parts) ، Brian (1 Part) ، Agar-agar ، heart infusion (0.7%)

٢. وسط TYGVS agar :

حضر الوسط TYGVS broth وأضيف إليه الأكار بنسبة ٠,٧ % .

بعد إذابة مكونات الأوساط الزرعية المذكورة أضيف إليها الحامض الدهني Isobutyric acid بنسبة ٠,٢ % ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٢ وبعد التعقيم أضيف المصل إلى الأوساط الزرعية بنسبة ٢% (Uitto *et al.*, 1995) كما أضيف المضاد الحيوي Rifampicin بتركيز 0.2 ملغم / ١٠٠ سم^٣ لكل الوسط (Leshine and Canale-Parola, 1980).

تحضير المصل: استخدم أحد أنواع المصول الآتية لأجل دعم نمو جراثيم *Treponema* وهي:

١. مصل الأرنب *Rabbit serum* :

أستخدم مصل الأرنب كما أشار إليه (Izard *et al.*, 2004) وتم الحصول عليه بسحب ١٠ سم^٣ من دم العضلة القلبية بعد تعقيم المنطقة بالكحول ووضعه في أنابيب اختبار معقمة خالية من المواد المانعة للتخثر .

٢. مصل العجول *Fetal calf serum (FCS)* :

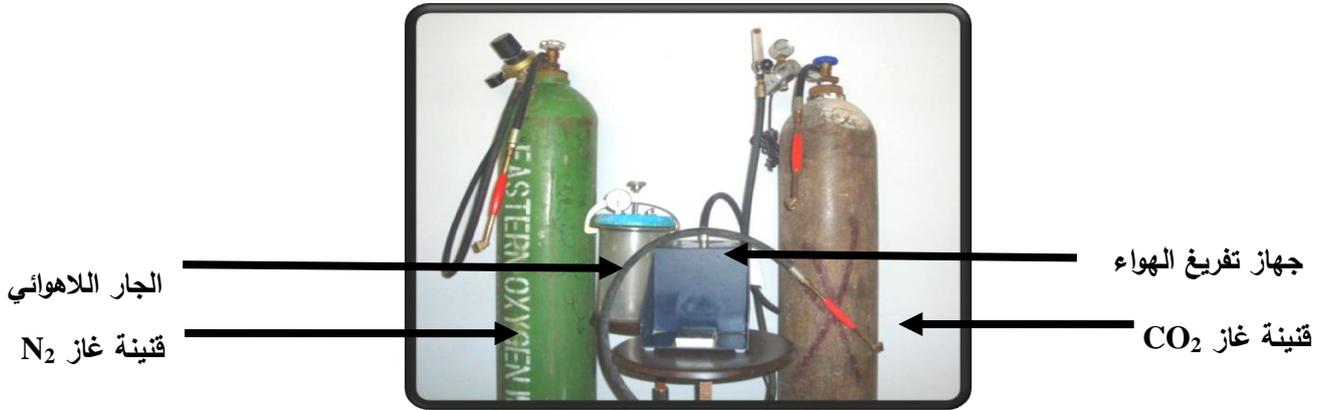
أستخدم مصل العجول كما أشار إليه (Wyss *et al.*, 2004) وتم الحصول عليه بسحب ٢٠ سم^٣ من دم الوريد الودجي Jugular vein في منطقة العنق بعد تعقيم المنطقة بالكحول ووضع في أنابيب اختبار معقمة خالية من المواد المانعة للتخثر .

٣. مصل الأبقار *Fetal bovin serum (FBS)* :

تم الحصول عليه بنفس الطريقة المتبعة مع مصل العجول واستخدم لدعم نمو الجرثومة. فصل المصل عن الخثرة المتكونة بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة ١٠ دقائق وسخن في حمام مائي بدرجة ٥٦ م° لمدة ٣٠ دقيقة لتنشيط فعالية المتمم وعقم باستخدام مرشحات بقطر ٠,٢ مايكروميتر وأضيف إلى الوسط (Starr et al., 1981).

الزرع على أوساط العزل الأولي السائلة:

زرعت العينات على أوساط العزل الأولي بتلقيح ٠,١ سم^٣ من السائل الناقل الملقح بالعينة في أنابيب كل من الأوساط الزرعية NOS, PPLO, PYG, TYGVS ووسط Thioglycolate ووضعت جميع الأنابيب في جار لاهوائي Anaerobic jar مجهز من شركة Oxiod مع أنبوب يحتوي على كاشف (Resazurin) Anaerobic indicator للتأكد من الظروف اللاهوائية إذ يتحول من اللون الوردي إلى عديم اللون في الظروف اللاهوائية، تم تفريغ الجار من الهواء باستخدام جهاز تفريغ الهواء Vaccume ثم أضيف إليه ١٠% من غاز ثاني أكسيد الكربون (CO₂) و ٨٠% من غاز النيتروجين (N₂) من القناني الخاصة بكل نوع من الغازين (الصورة ١) وحضن الجار عند درجة ٣٧ م° لمدة ٥ أيام مع اختبار ظهور النمو كل يوم .



الصورة ١: متطلبات التحضين اللاهوائي المستخدمة في الدراسة الحالية

الزرع على الأوساط الصلبة الخاصة بتنمية جراثيم *Treponema*:

بعد ظهور النمو في أوساط العزل الأولي السائلة تم الزرع في الأوساط الصلبة للحصول على مستعمرات منفردة من الجرثومة ودراسة أشكالها.

الاختبارات المظهرية :

حضرت مسحات جافة من المستعمرات وصبغت بصبغة كرام وكرام المحورة كما حضرت مسحات جافة ثانية وصبغت بصبغة فونتانا الخاصة بجراثيم Spirochetes حسب الطريقة التي وصفها (Collee *et al.*,1996) لمشاهدة الأشكال الحلزونية المميزة للجراثيم وفحصت بالمجهر الضوئي تحت قوة تكبير 1000X وصورت فوتوغرافياً بكاميرا رقمية .

النتائج والمناقشة

النمو على أوساط العزل الأولي:

في الدراسة الحالية استخدمت الأوساط الناقلة T-E و Normal saline و Reduced BHI broth لنقل العينات وجميعها أبدت كفاءة في إدامة حيوية العزلات أثناء النقل لحين إيصالها للمختبر وزرعها على الأوساط الغذائية بدلالة ظهور النمو في الأوساط الزرعية بعد تلقيحها بعينة الوسط الناقل. كما استخدمت خمسة أوساط غذائية للعزل الأولي تمكنت جميعها من توفير الاحتياجات التغذوية اللازمة لنمو جراثيم Treponema الفم خارج الجسم الحي *In vitro* إذ ظهر فيها النمو بحدوث تعكر بعد يومين من التحضين اللاهوائي مع قليل من الترسبات الدقيقة كما في الصورة (٢) والتي ازدادت لتصبح بشكل راسب كما في الصورة (٣) له مظهر اطلاقه الحرير عند رج أنبوب الزرع بعد ٤-٥ أيام من التحضين والموضح في الصورة (٤) .



وسط NOS



وسط PYG



وسط TYGVS

الصورة ٢: نمو جراثيم Treponema على أوساط العزل الأولي بشكل عكارة.

اليسار : (-)

اليمن: (+)



الصورة ٣: نمو جراثيم Treponema بشكل راسب.

A: وسط TYGVS ؛ B: وسط PYG ؛ C: وسط NOS



الصورة ٤: مظهر اطلاقه الحرير على وسط NOS.

أشار الباحثون (Socransky *et al.*, 1969) إلى أن نمو جراثيم Treponema الفم اللاهوائية في الأوساط السائلة يتوزع بشكل متساوٍ فيما ميز الباحثون (Wolf *et al.*, 1993) أربعة أشكال من الخلايا في مزرعة جراثيم Treponema هي الشكل الحلزوني الطبيعي والذي يوجد بشكل رئيس في راسح المزرعة وشكل الملتويات الملتفة أشبه بالصفيرة Plaits وشكل الملتويات الملتفة بشكل يشبه الهراوة Club-like structure وأجسام كروية بأحجام مختلفة وهذه الأشكال الثلاث توجد بشكل رئيس في راسب المزرعة ويمكن ملاحظة جميع هذه الأشكال بعد ٢-٣ يوم من التحضين مما يشير إلى كونها خلايا حية وافترض الباحثون ان التغيرات المظهرية يمكن أن تعود إلى إستراتيجيات التحمل وان تكوين الكرويات يختزل المساحة السطحية وبذلك يوفر اقل مساحة هدف لفعل الأجسام المضادة أو المواد السامة. كما أكد هذا الشكل من النمو الباحثون (Wyss *et*

(1996, *al.*) بملاحظتهم تكون راسب من الخلايا Cell Pellets نتيجة النمو الكثيف في الأوساط السائلة مع وجود حبيبات End granules في المزرعة.

في الدراسة الحالية احتوت جميع الأوساط المستخدمة للعزل الأولي على مصدر بروتيني ومصدر كربوهيدراتي بوصفها مغذيات أساسية للنمو إذ يحتوي وسط NOS على نقيع القلب والمخ BHI و Trypticase ومستخلص الخميرة Yeast extract بوصفها مصادر بروتينية و يحتوي وسط PPLO على مادة Beef extract والبيتون، كما احتوى وسط Thioglycolate و PYG على البيتون ومستخلص الخميرة بوصفها مصادر بروتينية أما وسط TYGVS فإنه يزود بالبروتين من التريتون و مستخلص الخميرة، كما زودت جميع الأوساط بالكلوكوز بوصفها مصدر كربوهيدراتي فضلاً عن تزويدها بالمصل والحامض الدهني Isobutyric acid مصدراً للأحماض الدهنية طويلة السلسلة والمتطايرة ودعمت كافة الأوساط بالحامض الاميني L- cysteine كمادة أساس لإنتاج H₂S وبالمادة المختزلة Sodium thioglycolate وكلاهما مركبان مهمان في إزالة الأوكسجين من الوسط ليصبح مختزلاً يسمح بنمو جراثيم Treponema اللاهوائية فضلاً عن استخدام الجار اللاهوائي Anaerobic jar للتحضين في ظروف بيئية لاهوائية عديمة الأوكسجين ومزودة بـ CO₂ و N₂ لضمان استمرار النمو في ظروف مختزلة مثالية وتم التأكد من ذلك بوضع الكاشف Resazurine كما موضح في الصورة (٥).



الصورة ٥: تحول لون الكاشف اللاهوائي من اللون الوردي الى عديم اللون تحت الظروف اللاهوائية.

أشار الباحثون Socransky وآخرون (١٩٦٩)، (١٩٦٤) إلى إمكانية استخدام وسط PPLO المدعم لتنمية أنواع Treponema الفم غير المعتمدة أو المعتمدة على المصل بعد تزويد الوسط الزراعي به أو بمادة Ascitic fluid وتحضينها في ظروف لاهوائية مثلى، كما استخدم الباحثون (Umemoto *et al.*, 1988)

وسط PPLO مزود بـ ٥% من مصّل الأرنّب لتتّمية جرّاثيم *Treponema* الفم في حجرة لاهوائية لمدة ٤ أيام بدرجة ٣٧ م.

استطاع الباحثون تنمية سلالات *Treponema* الفم اللاهوائية على وسطي Thioglycolate broth و TYGVS مزود بالمصّل اذ استخدم الباحثون (١٩٩٧) *Umamoto et al.* وسط TYGVS للزرع الثانوي المتتالي و وسط Thioglycolate medium بدون كلوكوز في إجراء الاختبارات الكيموحيوية للسلالات المعزولة. أما الباحثون (Lux et al., 2002) فقد استخدموا وسط TYGVS لتتّمية سلالات جرّاثيم *Treponema* في ظروف لاهوائية كما استخدم من قبل الباحثين (Miyamoto et al., ٢٠٠٦) لتتّمية عزلات الجرثومة في ظروف لاهوائية لمدة ٤ أيام.

أما وسط NOS فقد استخدم من قبل عدة باحثين لتتّمية أنواع مختلفة من *Treponema* الفم إذ استخدم من قبل الباحثين (Limberger et al., ١٩٩٩) بعد تزويده بـ ١٠% من مصّل الأرنّب و 0.5% اكاروز لأجل الحصول على مستعمرات هذه الجرّاثيم كما استخدمه الباحثون (Edwards et al., 2003) لتتّمية وإدامة عزلات الجرثومة بعد تزويده بـ ١٥% كليسيرول.

أما بالنسبة لوسط PYG فإنه يحتوي على المتطلبات التغذوية الأساسية لنمو جرّاثيم *Treponema* فهو يوفر المتطلبات البروتينية والكربوهيدراتية اللازمة لنموها إذ أشار الباحث Johnson (1976) إلى أن أغلب سلالات *Treponema* تنمو بشكل جيد خارج الجسم الحي *In vitro* عندما يحتوي الوسط القياسي Base medium على البيبتون ومستخلص الخميرة ويظهر النمو عندئذ خلال ١٤-١٥ يوم في حين انه بإضافة مصدر كربوهيدراتي مثل الكلوكوز فسيظهر النمو بعد يومين من التحضين.

وفي دراستنا أضيف المصّل بنسبة ٢% وجميع أنواع المصّل المستخدمة (مصّل الأرنّب ومصّل العجول ومصّل الأبقار) كانت كفوءة في دعم النمو. يعد المصّل من مدعّمات النمو الأساسية لعزل جرّاثيم *Treponema* المعتمدة على المصّل بوصفه مصدراً مهماً لتوفير الأحماض الدهنية طويلة السلسلة اللازمة لنموها، وان إضافة المصّل أو السوائل البايولوجية المماثلة كالدّم أو Ascitic fluid إلى الوسط الزرعي يكون ضرورياً عند زرع جرّاثيم *Treponema* اللاهوائية المعزولة من الإنسان (Hardy and Munro, 1966) ولوحظ أن المصّل سواءً من الإنسان Human serum أو من الحصان Horse serum أو الأبقار (FBS) Fetal bovin serum أو من العجول (FCS) Fetal calf serum أو مصّل أرنّب يكون مشجعاً للنمو (Wyss, 1992 ; Izard et al., 2004) .

في دراستنا احتوت كافة الأوساط الزرعية على مادة Sodium thioglycolate المهمة في اختزال الوسط الزرعي بخفض الجهد الاختزالي الوسط وجعله ملائماً لنمو هذه الجرّاثيم اللاهوائية فضلاً عن الحامض الدهني Isobutyric acid بوصفه مصدراً للأحماض الدهنية الطيارة، وقد استدل مسبقاً على أهمية توفر هاتين

المادتين في اوساط تنمية جراثيم *Treponema* اللاهوائية من نتائج دراسة الباحث Socransky واخرين عام ١٩٦٤ اذ لاحظ الباحثون قدرة *Treponema* الفم على النمو في اوساط زرعية مختلفة بوجود جراثيم فم أخرى لاهوائية اختيارية بوصفها جراثيم داعمة للنمو أو بوجود راشح مزرعة الجراثيم الداعمة لتزويدها الوسط الزرعى بعناصر أساسية لنمو و تكاثر أنواع *Treponema* وتقليل الجهد الاختزالي Eh للوسط ليقارب القيمة المثلى (-190mv) لنموها. كما تمكن الباحثون من إيجاد عوامل نمو بديلة عن الكائنات الداعمة أو راشحها فقد توصلوا إلى إمكانية استبدال راشح مزرعة *Fusiform* بالحامض الدهني *Isobutyric acid* وراشح مزرعة *Diphtheria* بمادة *Putrescin*، كما وأشار الباحثون إلى إمكانية الحصول على أعلى نمو لسلاطات *Treponema* المعزولة بإضافة *Sodium thioglycolate* (0.002 ملغم/سم³) أو *Putrescin dihydrochloride* (0.25 ملغم/سم³).

وبين الباحثون أن احد أهم مكونات الوسط الزرعى هي العوامل المختزلة لضمان الجهد الاختزالي القليل في ظروف النمو مثل إضافة مادة *Dithiothreitol*، في حين أشار باحثون آخرون إلى حفظ الوسط الزرعى المستخدم لتنمية جراثيم *Treponema* في ظروف لاهوائية يستمر فيها سحب الأوكسجين وإضافة النيتروجين قبل زرع الجرثومة لضمان خفض Eh الوسط (Brooks *et al.*, 2007; Yoshid *et al.*, 2004).

وتوصلت الدراسات السابقة إلى أن أفضل حامض دهني يستخدم لتعزيز نمو جراثيم *Treponema* هو *Isobutyric Acid* فقد قام الباحثان Hardy و Munro (١٩٦٦) باختبار قدرة أنواع من الأحماض الدهنية الطيارة وأملاحها على دعم نمو هذه الجراثيم وثبت أن *Isobutyric acid* وأملاحه أكفأها في دعم النمو وإضافته إلى الوسط الزرعى يمكن أن تختزل حاجة هذه الجراثيم للمصل إذ انه يكافئ تأثير ١٠% من المصل في الوسط ذلك لأنه يزود الهياكل البنائية للأحماض الدهنية الطويلة السلسلة والالديهيدات المهمة في البناء الحيوي للخلية الجرثومية. فضلاً عن ذلك لاحظ الباحث (Wyss, 1992) اعتماد عزلات *Treponema* الفم على الحامض الدهني المذكور وبصورة إجبارية.

في دراستنا أضفنا مادة *Sodium bicarbonate* بنسبة ٢ غرام/ لتر إلى الأوساط الزرعى NOS، PPLO، PYG، TYGVS لتسريع معدل نمو جراثيم *Treponema* إذ وصف الباحثون مادة *Bicarbonate* أنها أحد عوامل النمو الأساسية والتي يمكن ان تكون بديلاً عن عوامل النمو التي تزودها الكائنات الداعمة *Diphtheriods* المتعايشة مع *Treponema* الفم، كما لاحظ الباحثون انه عند تزويد الوسط بالحامض الدهني *Isobutyric acid* فقط فان طور التطبع *Lag Phase* يصبح طويلاً في حين أن إضافة *Sodium bicarbonate* تساعد في تقليل طور التطبع وزيادة سرعة النمو كونها تعادل التأثير التثبيطي لبعض المواد في المصل والأحماض الدهنية طويلة السلسلة المضافة الى الوسط فضلاً عن كونها مصدراً لل

CO₂ الذي يستهلك في كثير من تفاعلات البناء الحيوي ومنها مسار بناء الأحماض الدهنية طويلة السلسلة (Hardy and Munro, 1966 ; Chan *et al.*,1993).

احتوت كافة الأوساط الزرعية المستخدمة في دراستنا على الحامض الاميني L-cysteine مما عزز قدرتها على تنمية جراثيم Treponema اللاهوائية ويعرف Cysteine بأنه محفز لأنزيمات Protease وانه يشارك مع الحديد في ضراوة الجرثومة وكلاهما يزيد من تحمل وستراتيجيات الضراوة التي تبديها الجرثومة (Chu *et al.*, 2002).

وتوصل الباحثان (Lai and Chu, 2008) الى أن جراثيم Treponema تستطيع النمو خلال أربعة أيام معتمدة على وجود L-Cysteine أو Glutathione بوصفها مادة أساس لإنتاج H₂S، وسجل الباحثان اقل مستوى للاوكسجين 0 - 0.6% مع التركيز العالي للـ H₂S والذي يعد عاملاً مختزلاً قوياً بتفاعله معه منتجاً H₂O و Sulfate مما يشير إلى قدرة الجرثومة على توليد ظروف قليلة التهوية ودورها في إبقاء البيئة لاهوائية في المناطق المصابة لحول الأسنان وان كمية H₂S المنتجة عند استخدام المادة الأساس Cysteine اكبر مما في حالة استخدام مواد أساس أخرى.

ولتشجيع النمو فقد أضفنا مادة Ascorbic acid بدلاً عن TPP حيث أشار (Wyss, 1992) إلى أن التراكيز العالية للـ Ascorbic acid لحد ١ ملغرام/ لتر تزيد من نمو بعض أنواع جراثيم Treponema الفم . لأجل الحصول على وسط انتخابي لجراثيم Treponema الفم فقد أضفنا المضاد الحيوي Rifampcin بنسبة 0.2 ملي غرام/١٠٠ سم³ اذ يعد استخدام المضاد في أوساط العزل طريقة ناجحة وفعالة للحصول على عزلات نقية لهذه الجراثيم من الإصابات المختلطة مثل إصابات ما حول الأسنان، فضلاً عن أن استخدام المضادات للعزل الانتخابي لجراثيم Treponema الفم يساعد في تخطي بعض العقبات التي تواجه طريقة العزل الانتخابي باستخدام المرشحات أو طريقة الحفر على سطح الاكار فهذه الطرائق التقليدية للعزل الانتخابي ستكون انتقائية فقط لأنواع الملتويات الأسرع في الحركة والهجرة خلال الاكاروز أو الأنواع النحيفة بشكل كافٍ يمكنها من اختراق المرشحات الدقيقة في حين أن استخدام المضاد يسهل الحصول على مستعمرات متميزة للأنواع النامية ببطء وعزل مزارع نقية منها مع تقليل احتمالية التلوث (Leschine and Canale-parola, 1980).

يتفاعل المضاد Rifampcin مع الوحدة الثانوية β - Subunit للأنزيم البلمرة DNA – dependent RNA Polymerase (Rpo β) المشفر من قبل الجين *rpo β gene* ، وان مقاومة جراثيم الملتويات له تنشأ عن حدوث تغيرات في تتابع الأحماض الامينية للموقع الفعال الذي يرتبط معه المضاد مما يسبب قلة الفة أنزيم Rpo β له كما قد تنشأ المقاومة عن قلة نفاذية الغشاء الخلوي للجرثومة لهذا المضاد، وقد تمكن عدد من

الباحثين من عزل سلالات *Treponema* مقاومة لتراكيز نوعاً ما عالية من المضاد ولم تعزل سلالات من جراثيم الملتويات حساسة له (Stamm *et al.*, 2001).

النمو على الأوساط الصلبة الخاصة بتنمية جراثيم *Treponema*

في هذه الدراسة استخدم وسط TYGVS agar ووسط Thioglycolate-BHI agar اللذين يحتويان على ٧,٠% اكار للحصول على مستعمرات منفردة متميزة وعزل المستعمرات المختلفة مظهرياً عن بعضها. ظهرت اغلب المستعمرات بشكل مستعمرات دائرية بيضاء-رمادية ابعادها ≤ 3 ملم على وسط TYGVS agar كما في الصورة (٦) وقد ظهرت بعض المستعمرات ذات حواف منتظمة والأخرى ذات حواف غير منتظمة على وسط Thioglycolate-BHI agar كما في الصورة (٧) كما اظهر بعضها مستعمرات كثيفة بيضاء او صفراء كما في الصورة (٨) كما بدت بعض المستعمرات ذات تحذب قليل كما مبين في الصورة (٩) والقليل منها كان بشكل مستعمرات شفافة، وقد تم عزل كل نوع مظهري من هذه المستعمرات وأجريت له الفحوصات التشخيصية لجراثيم *Treponema*.



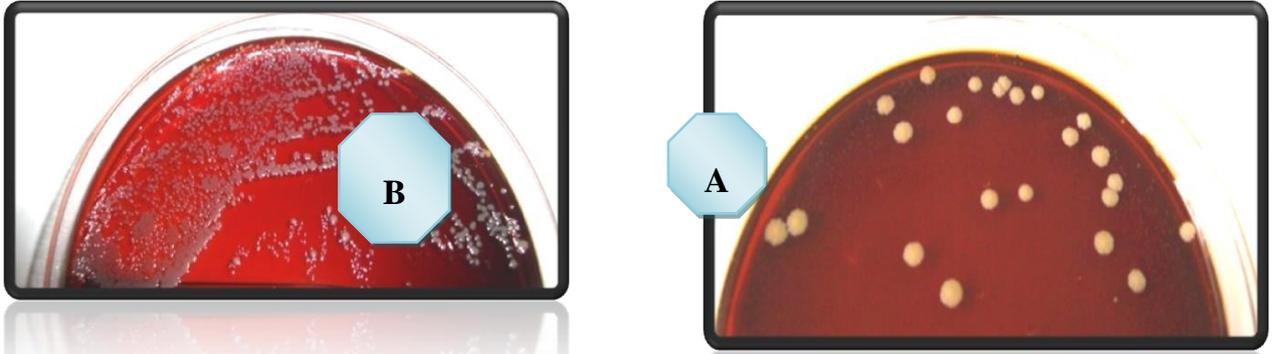
الصورة ٦: مستعمرات جراثيم *Treponema* على وسط TYGVS Agar.



الصورة ٧: مستعمرات جراثيم *Treponema* على وسط Thioglycolate-BHI Agar

A : مستعمرات بيضاء - رمادية منتشرة ذات حواف غير منتظمة

B : مستعمرات بيضاء - رمادية ذات حواف منتظمة



الصورة ٨: مستعمرات جراثيم *Treponema* على وسط Thioglycolate-BHI Agar

A : مستعمرات صفراء ، B: مستعمرات بيضاء-رمادية كثيفة ذات حواف منتظمة



الصورة ٩: مستعمرات جراثيم *Treponema* ذات تحذب قليل على وسط Thioglycolate-BHI Agar

استخدم الباحثون (Socransky *et al.*, 1964) وسط PPLO للعزل الأولي لجراثيم *Treponema* ثم عن طريق النقل المتتالي للمستعمرات السطحية النامية على وسط PPLO المضاف إليه ١,٢ % اكار تمكن من عزل مستعمرات منفردة لكل نوع من *Treponema* الفم ولاحظ أنها تستطيع النمو بشكل مستعمرات سطحية Surface colonies أو شبه سطحية Subsurface colonies عند استخدام اقل تركيز من الاكار، كما أشار (Starr *et al.*, 1981) إلى استخدام أي وسط من أوساط العزل الأولي يعطي نمواً كثيفاً لأغراض التنمية

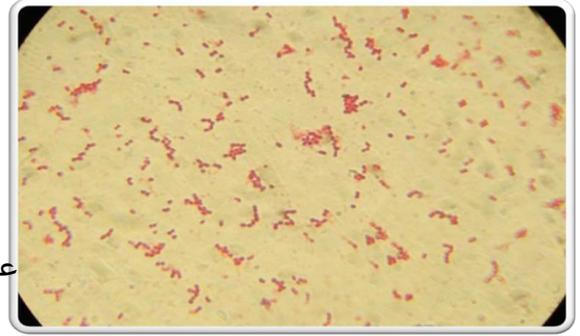
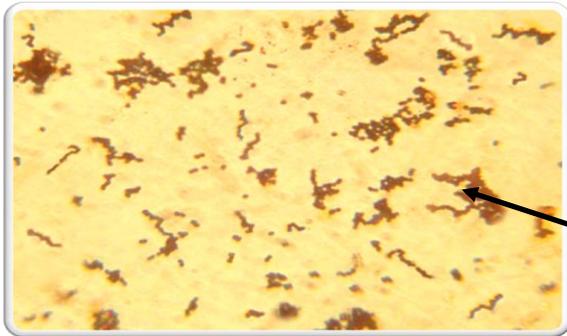
والزرع المتتالي و بإضافة ٠,٧ % اكار له يمكن الحصول على النمو السطحي لمستعمرات هذه الجراثيم. واعتمد الباحثان Jacob و Nauman (1982) , على وسط PPLO مع إضافة ١٠% مصل أرنب لتنمية الجرثومة واستخدما نفس الوسط مع إضافة الاكار لتنمية مستعمراتها.

أشار الباحثان Leschine و Canale-Parola (١٩٨٠) إلى اختلاف مستعمرات سلالات *Treponema* بالحجم والشكل فبعضها ينمو على شكل مستعمرات صغيرة منتشرة ٣ ملم وبعضها بأبعاد ٥ ملم والبعض الآخر له مظهراً شفافاً *Transparent*. أما الباحث (Umamoto *et al.*, ١٩٨٤) فقد أشار إلى أن مستعمرات السلالات المعزولة من الفم تكون أبعادها ٥-١٥ مايكرومتر وذات حواف غير منتظمة، وان مستعمرات نفس السلالة قد تكون صغيرة أو كبيرة وعند الزرع الثانوي من هذه المستعمرات فإنها تنتج نفس النوع من المستعمرات مما قاد إلى الافتراض بأن الصفات المورفولوجية للمستعمرات تختلف حتى بين سلالات النوع نفسه.

إن تخطيط العينة على الوسط الصلب يكون ضرورياً للحصول على مستعمرات مفردة متميزة لغرض الزرع الثانوي وهذه الخطوة تحتاج جهداً وتستغرق وقتاً طويلاً لاختلاف أشكال المستعمرات لذا يبقى من غير الواضح فيما إذا كانت المستعمرة المفردة التي حضر منها الزرع الثانوي قد نشأت من نمو نوع واحد ام من عدة أنواع لذلك من الصعب جدا تأكيد الحصول على مزارع نقية لعزلات الملتويات من الصفيحة الجرثومية للسن (Wardle, 1997).

الاختبارات المظهرية

بدت الخلايا الجرثومية في المسحات المثبتة المصبوغة بصبغة كرام المحورة بأنها جراثيم سالبة لصبغة كرام حلزونية بأطوال مختلفة بعضها ملنو بشدة وبعضها ضعيف الالتواء كما موضح في الصورة (١٠) كما أنها ضعيفة الاصطباج بصبغة السفرانين. بدت الخلايا حلزونية بشكل أوضح عند صبغها بصبغة فونتانا الخاصة بجراثيم الملتويات إذ 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 (١١).



عش التوالد

الصورة ١٠: خلايا جراثيم *Treponema* مصبوغة بصبغة كرام المحورة تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 1000X.

الصورة ١١: خلايا جراثيم *Treponema* مصبوغة بصبغة فونتاننا تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 1000X.

إن كل أنواع الملتويات متشابهة مظهرياً عند فحصها بالمجهر الضوئي وأحياناً توجد بشكل سلاسل ملتوية بقوة *Tightly coiled* او ضعيفة الالتواء *Lossely wounds* أو أن الالتواء غير منتظم *Irregular coild* وهي جراثيم سالبة لصبغة كرام وتصطبغ بمستوى ضعيف بالصبغة المضادة السفرائين. وفي حين أن جراثيم الملتويات الكبيرة مثل *Borrelia* يمكن أن تصطبغ بطرائق التصبيغ الاعتيادية ومنها صبغة كرام (تبدو سالبة لصبغة كرام)، صبغة لثمان، صبغة كيمزا إلا أن الملتويات الصغيرة مثل *Treponema* و *Leptospira* فإنها رقيقة جداً ولا يمكن مشاهدتها بطرائق التصبيغ الاعتيادية وتشاهد بحال أفضل في التحضيرات الرطبة غير المصبوغة تحت مجهر الحقل المظلم اذ يلاحظ شكلها وحركتها، أما في التحضيرات المثبتة فيجب استخدام طريقة الإشباع بالفضة والتي تزيد سمك هذه الجراثيم بعد ترسب الفضة عليها كما في طريقتي *Fontana* (للمسحات المثبتة على الشرائح الزجاجية) وطريقة *Levaditi* للمقاطع النسيجية (Collee *et al.*, 1996; Goering *et al.*, 2008).

المصادر الأجنبية

- Brooks, G. F. ; Butel, J. S. ; Morse, S. A. (2007). "Jawetz, Melnick and Adelerg's Medical Microbiology". 24th edn. , McGraw-Hill Inc. , USA.
- Chan, E. C. S.; Siboo, R.; Keng, T. (1993). *Treponema denticola* (ex Brumpt 1925) sp. no. nom. rev. , and identification of new spirochete isolates from periodontal pocket. *Int. J. Sys. Bacteriol.* , **43**, 196-203.
- Chu, L.; Dong, Z.; Xu, X.; Cochran, D. L.; Ebrsole, J. L. (2002). Role of glutathione metabolism of *Treponema denticola* in bacterial growth and virulence expression. *Infect. Immun.* , **70**(3) , 1113-1120.
- 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.
- Desvarieux, M.; Demmer, R. T.; Tatjana, R. ; Boden-Albala, B. B. ; Jacobs, D. R. ; Sacco, R. L. ; Papanou, P. N. (2005). The oral infections and vascular disease epidemiological study (INVEST). *Circulation, American Heart Association*, **111**, 576-582.
- Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures.(1998). 9th edn., Difco Laboratories Inc. , Detroit, Michigan, USA.

- Edwards, A. M.; Dymock, D.; Woodward, M. J.; Jenkinson, H. F. (2003). Genetic relatedness and phenotypic characteristics of *Treponema denticola* associated with human periodontal tissues and ruminant foot disease. *Microbiol.* , **149**, 1083-1093.
- Edwards, A. M. ; Jenkinson, H. F. ; Woodward, M. J. ; Dymock, D. (2005). Binding properties and adhesion- mediating region of the major surface protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect. Immun.* , **73**(5) , 2891-2898.
- Fenno, J. C.; Tamura, M.;Hannam,P.M.;Wong,G. W. K. ; Chan, R. A. ; McBride, B. C. (2000). Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. *Infect. Immune.*,**68**(4): 1884-1892.
- 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.
- Hardy, P. H. ; Munro, C. O. (1966). Nutritional requirement of anaerobic Spirochetes I demonstration of isobutyric and bicarbonate as growth factor for a strain of *Treponema microdentium*. *J. Bacteriol.* , **91**(1) , 27-32.
- Izard, J. ; McEwen, B. F. ; Barnard, R. M. ; Portuese, T. ; Samsonoff, W. A. ; Limberger, R. H. (2004). Tomographic reconstruction of Tryponemal cytoplasmic filaments reveals novel bridging and anchoring components. *Mol. Microbiol.* , **51**(3), 609-618.
- Jacob, E. ; Nauman, R. K. (1982). Common antigens of *Treponema denticola*: chemical, physical, and serological characterization. *Infect. Immun.* , **37**(2) , 474-486.
- Johnson, R. C. (1976). "The Biology of Parasitic Spirochetes". Academic Press, New York.
- Kasuga, Y. ; Ishihara, K. ; Okuda, K. (2000). Significant detection of *Porphyromonas gingivalis*, *B. forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pocket. *Bull. Tokyo. dent. Coll.* , **41**(3) , 109-117.
- Kecis, L. ; Milasin, J. ; Igetic, M. ; Obradovic, R. (2008). Microbial etiology of periodontal disease- minireview. *FACTA Universitalis*, **15**(1) , 1-6.
- Lai, Y. ; Chu, L. (2008). Novel mechanism for conditional aerobic growth of anaerobic bacterium *Treponema denticola*. *Appl. Environ. Microbiol.* , **74**(1) , 73-79.
- Lennette, E. H. ; Balows, A. ; Hausler, J. R. ; ShaDomy, H. J. (1985). "Manual of Clinical Microbiology " . 4th edn. , American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Leschine, S. B. ; Canale-Parola, E. (1980). Rifampicin as a selective agent for isolation of oral Spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* , **12**(6) , 792-795.
- Limberger, R. J. ; Slivienski, L. L. ; Izard, J. ; Samsonoff, W. A. (1999). Insertional inactivation of *Treponema denticola* *tap1* results in a non motile mutant with elongated flagellar hook. *J. Bacteriol.* , **181**(12) , 3743-3750.
- Lux, R. ; Sim, J. H. ; Tasia, J. P. ; Shin, W. (2002). Construction and characterization of *cheA* mutant of *Treponema denticola*. *J. Bacteriol.* , **184**(11), 3130-3134.
- 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-1 β (IL- 1 β), IL- 6 and TNF Alpha. *Infect. Immun.* , **74**(4) , 2462-2467.

- Prescott, L. M. ; Harley, J. P. ; Klein, D. A. (2005). " Microbiology". 6 edn , McGraw-Hill , Inc. , USA.
- Socransky, S. S. ; Loesche, W. J. ; Hubersak, C. ; Macdonald, J. B. (1964). Dependency of *Treponoma microdentium* on other oral organism for isobutyrate polyamines and a controlled oxidization – reduction potential. *J. Bacteriol.* , **88**(1) , 200-209.
- Socransky, S. S.; Listgarten, M.; Hubersak, C.; Cotmoro, J.; Clark, A.(1969). Morphological and biochemical differentiation of three types of small oral Spirochetes. *J. Bacteriol.*, **98**(3) , 878-882.
- Stamm, L. V. ; Bergen, H. L. ; Shangraw, K. A. (2001). Natural Rifampicin resistance in *Treponema* spp. correlates with presence of N531 RopB Rifampicin cluster 1 . *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **45**(10) , 2973-2974.
- Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G.; Balows, A.; Schlegel, H. G.(1981)."The Prokaryotes. A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria". Vol. I, Berlin Heidelberg, New York.
- Tucci, S. ; Martin, W. (2007). A novel prokaryotic trans-2-enoyl-coA reductase from the spirochetes *Treponema denticola*. *FEBS letters*, **581**, 1560-1566.
- Uitto, V. J. ; Pan, M. Y. ; Leung, W. K. ; Larjava, H. ; Ellen, R. P. ; Finaly, B. B. ; McBride, B. C. (1995). Cytopathic effect of *Treponema denticola* chymotrypsin –like proteinase on migrating and stratified epithelial cells. *Infect. Immun.* , **63**(9), 3401-3410.
- 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.
- Umamoto, T. ; Namikawa, I. ; Yamamoto, M. (1984). Clonial morphology of Treponemes observed by electron microscopy. *Microbiol. Immunol.* , **28**(1) , 11-22.
- Umamoto, 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.
- Umamoto, 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.
- Wardle, H. M. (1997).The challenge of growing oral spirochetes. *J. Med. Microbiol.*, **46**,104-116.
- Willis, S. G. ; Smith, K. S. ; Dunn, V. L. ; Gapter, C. A. ; Riviere, K. H. ; Riviere, G. R. (1999). Identification of seven *Treponema* sp. in health- and disease- associated dental plaque by Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* , **37**(3) , 867-869.
- Wolf, V. ; Lange, R. ; Wecke, J. (1993). Development of quasi-multicellular bodies of *Treponema denticola*. *Arch. Microbiol.* , **160**, 206-213.
- Wyss, C. (1992). Growth of *porpheromonas gingivalis* , *Treponema denticola* , *T. pectinovorum* , *T. socranskii* , ; *T. vinecentii* in a chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* , **30**(9) , 2225-2229.
- Wyss, C. Choi, B. K. ; Schüpbach, P. ; Guggenheim, B. ; Göbel, U. B. (1996). *Treponema maltophilum* sp. nov. , A small oral Spirochetes isolated from human periodontal lesion. *Int. J. Sys. Bacteriol.* , **46**(3) , 745-752.

- Wyss, C. ; Moter, A. ; Choi, B. K. ; Dewhirst, F. E. ; Xue, Y. ; Schuphach, P. ; Göbel, U. B.; Paster, B. J. ; Guggenheim, B. (2004). *Treponema putidum* sp. nov. , a medium-sized proteolytic Spirochete isolated from lesions of human periodontitis and necrotizing ulcerative gingivitis. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **54** , 1117-1122.
- Yoshid, A. ; Kawada, M. ; Suzuki, N. ; Nakano, Y. ; Oho, T. ; Saito, T. ; Yamashita, Y. (2004). Taq-Man Real- Time PCR assay for the correlation of *Treponema denticola* number with severity of periodontal disease. *Oral. Microbiol. Immunol.* , **19**, 196-200.