

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Caio Vinícius Gonçalves Roman Torres

**PREVALÊNCIA, EXPRESSÃO DE LEUCOTOXINA E
SOROTIPOS DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
E SUA ASSOCIAÇÃO À DOENÇA PERIODONTAL**

Taubaté-SP
2009

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Caio Vinícius Gonçalves Roman Torres

**PREVALÊNCIA, EXPRESSÃO DE LEUCOTOXINA E
SOROTIPOS DE *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
E SUA ASSOCIAÇÃO À DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia
do Departamento de Odontologia da Universidade
de Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

Co-orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen

Taubaté-SP
2009

CAIO VINÍCIUS GONÇALVES ROMAN TORRES

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Dedico este trabalho aos meus pais Vera e Luiz:

Por todo incondicional amor,

Pelos ensinamentos, que fizeram chegar aqui;

Sempre presentes em todas as ocasiões, todas as horas, toda vida.

A minha noiva Marta:

Amor da minha vida;

Minha eterna companheira;

Mais fiel colaboradora.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Pró-reitor de Pesquisa e Pós-graduação da UNITAU, pela amizade, dedicação, paciência, sabedoria e, principalmente, por ter conseguido passar ensinamentos não apenas ao aluno, mas também ao homem.

À Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, coordenadora da Periodontia da UNITAU, pela confiança e amizade sempre demonstrada.

Ao Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, pela amizade, disponibilidade e sabedoria com que auxiliou em toda etapa laboratorial.

À Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UNITAU, pela amizade e oportunidades oferecidas.

Ao amigo Davi Romeiro Aquino, companheiro de mais uma caminhada, obrigado por toda ajuda e disponibilidade infinita.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Placido Penna, grande incentivador desde o início, por sempre acreditar na minha capacidade.

As minhas irmãs, Débora e Bia e cunhados Alexandre e Flavio, por toda paciência e colaboração ao longo desse curso.

À minha segunda mãe, Flora, por toda preocupação, cuidados infinitos e amor a toda prova.

Aos amigos, Marcelo Barbieri, Jorginho Barbosa, Junior, Murilo, Paulo Macedo, Rui Manuel e Victor pelo constante incentivo e sábios conselhos.

Aos colegas de turma do Doutorado, Camila, Evania, Fabiano, Marcelo, Nivaldo e Talmir, pelos inesquecíveis momentos de convívio.

A amiga Juliana Guimarães Santos, técnica do laboratório de biologia molecular da UNITAU, pela dedicação com que auxiliou no processamento das amostras.

Aos funcionários da Pós-graduação Adriana e Ricardo pela preocupação, carinho e capacidade com que conduziram toda documentação do curso.

À Profa. Dra. Marinella Holzhausen, por todo apoio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

À todos os professores do programa de Doutorado em Odontologia da UNITAU, pelo conhecimento transmitido.

Aos pacientes que possibilitaram a execução deste trabalho.

A bibliotecária Regina Cuba, por toda ajuda e paciência durante as correções deste trabalho

À UNITAU, por mais uma oportunidade oferecida.

ROMAN-TORRES CVG. Prevalência, expressão de leucotoxina e sorotipos de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e sua associação à doença periodontal Tese de doutorado. Taubaté: Universidade de Taubaté, Faculdade de Odontologia, 2009. 97p.

RESUMO

Estudos indicam que indivíduos com lesões periodontais severas apresentam maior probabilidade de serem colonizados por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade (max LTX), enquanto, clones de mínima leucotoxicidade (min LTX) se associam a indivíduos com reduzida perda de inserção conjuntiva e óssea alveolar. Além disso, a severidade da doença periodontal pode se relacionar com a expressão de antígenos sorotipos-específicos de *A. actinomycetemcomitans*. **Objetivo:** Assim, este estudo transversal avaliou a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, a expressão de max LTX e min LTX leucotoxicidade e seus sorotipos *a*, *b*, *c*, *d*, *e* e *f* nas amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* oriundas desta população. **Método:** Foram alocados no presente estudo 764 indivíduos adultos diagnosticados com periodontite incipiente, periodontite crônica 1, 2 e 3 e periodontite agressiva. Após detalhada anamnese, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, Índice de Placa e Índice Gengival foram mensurados e amostras subgengivais foram coletadas dos primeiros molares e incisivos centrais. O procedimento de identificação dos genótipos e sorotipos foi realizado por meio da reação em cadeia da polimerase. Teste Qui-quadrado ($P < 0,05$) foi utilizado para comparar as médias dos valores clínicos em relação aos microbianos. **Resultados:** A prevalência do microrganismo para a população em geral foi de 15,18%. Cepas de min LTX foram mais prevalentes do que as de max LTX ($p < 0,05$) em toda população estudada. Indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva apresentaram somente cepas de min LTX. O sorotipo *b* mostrou-se mais prevalente em indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva enquanto os sorotipos *a* e *c* estiveram associados com indivíduos diagnosticados com periodontite crônica. **Conclusões:** Os dados obtidos neste estudo mostram similaridade com os estudos de prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em diferentes países. Cepas de max LTX nem sempre estão relacionadas com indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva. Nossos dados confirmaram ainda a relação dos sorotipo *b* com periodontite agressiva, e os fatores idade e gênero não foram associados com leucotoxicidade e sorotipos.

Palavras-chave: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Doenças periodontais; Sorotipagem; Etnologia.

ABSTRACT

Previous studies suggest that individuals with advanced periodontal lesions harbor significantly more highly leucotoxic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* than minimally leucotoxic *A.actinomycetemcomitans*, while, minimally leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* samples are related to less severe periodontal disease. In addition, some authors have also implicated the serotype-specific antigens of *A. actinomycetemcomitans* with the severity of disease. **Aim:** Thus, the aim of the present study was to consider the prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, the expression of highly leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* and minimally leucotoxic of *A. actinomycetemcomitans* and the presence of serotype-specific *a, b, c, d, e* and *f* antigens from positive samples of *A. actinomycetemcomitans*. **Methods:** A total of 764 adult individuals diagnosed early onset periodontitis, chronic periodontitis 1, 2 and 3 and also aggressive periodontitis will be enrolled in this survey. After anamnesis, all of the patients will receive clinical examinations such as: periodontal pocket deep; clinical attachment loss; plaque and gingival indexes. Subgingival samples from first molars and central incisors were collected to microbial analysis. The genomic and serotype-specific DNA of *A. actinomycetemcomitans* were provided by polymerase chain reaction (PCR). Chi-square test ($P<0.05$) was provided to compare the mean values of clinical data according to microbial results. **Results:** Our results showed that the prevalence of positive samples of *A. actinomycetemcomitans* reached 18.4%. In general, minimally leucotoxic *A.actinomycetemcomitans* were statistically significantly more prevalent than highly leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* ($p<0.05$). Subjects diagnosed aggressive periodontitis showed only samples of minimally leucotoxic of *A. actinomycetemcomitans*, however, these patients harbored more serotype-specific *b* when we compared with chronic periodontitis subjects. On the other hand, serotypes-specific *a* and *c* were associated with chronic periodontitis subjects. **Conclusions:** Our prevalent data was similar with several prevalent studies with different populations around the world. Very few samples of highly leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* were detected. This particular condition not allowed to associate highly leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* with severity of disease and also with serotype-specific. We observed a positive relationship between serotype *b* and aggressive periodontitis subjects. The risk factors, age and gender were not associated with leucotoxic or serotypes of *A. actinomycetemcomitans*.

Keywords: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Periodontal diseases; Serotyping; Ethnicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 PREVALÊNCIA DE <i>A. actinomycetemcomitans</i>	13
2.2 EXPRESSÃO DE LEUCOTOXINA E SOROTIPOS	17
3 PROPOSIÇÃO	27
3.1 OBJETIVOS GERAIS	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES	28
4.3 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CLÍNICA PERIODONTAL	29
4.4 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA	30
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	31
4.6 SÍTIOS E MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS	31
4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	32
4.7.1 Extração de DNA genômico	32
4.7.2 Detecção de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> e identificação dos genótipos JP2 e 652 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

A presença de bactérias específicas no biofilme dental tem sido reconhecida como fator inicializador e de progressão da doença periodontal. Particularmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), que pode ser isolado de várias infecções tanto intra como extra bucal, parece ter um papel fundamental na patogênese de algumas formas de doença periodontal, mais especificamente das chamadas periodontites agressivas localizadas (Socransky et al., 1999; Fine et al., 2007).

A patogenicidade de *A. actinomycetemcomitans* é atribuída, entre outros fatores de virulência, a expressão de uma leucotoxina pertencente à família de proteínas RTX codificada por quatro genes designados *ltxC*, *ltxA*, *ltxB*, e *ltxD* (Kraig et al., 1990; Lally et al., 1991).

Estudos têm mostrado diversidade genética de *A. actinomycetemcomitans* em amostras isoladas de populações asiáticas, européias e norte americanas (Zambon et al., 1983; Asikainen et al., 1995; Haubek et al., 1995, 1997, 2002; Paju et al., 2000; Haraszthy et al., 2000; Kaplan et al., 2001). Esta diversidade expressa diferentes cepas leucotóxicas; a saber, cepas de máxima (amostras JP2-Max LTX) ou de mínima leucotoxicidade (amostras 652-Min LTX).

Além disso, amostras de *A. actinomycetemcomitans* podem ser classificadas de acordo com a expressão fenotípica. Por exemplo, amostras de *A. actinomycetemcomitans* sorotipos **a** e **b** são frequentemente isoladas de indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva localizada, amostras de sorotipos **c** são mais comuns em infecções não bucais e em indivíduos periodontalmente saudáveis, enquanto os sorotipos **d**, **e** e **f** são raros em todas as populações (Zambon et al.,

1983; Haubek et al., 1995; Asikainen et al., 1995; Paju et al., 2000; Kaplan et al., 2001, 2002).

No Brasil, nosso grupo já realizou alguns estudos no sentido de caracterizar indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva ou crônica em relação à expressão de leucotoxina (Cortelli et al., 2003, 2005), todavia, a expressão fenotípica de antígenos sorotipos-específicos em populações brasileiras foram somente avaliados em dois estudos. Inicialmente Tinoco et al. (1997) observaram que a presença do sorotipo **c** foi mais frequente nas bolsas periodontais principalmente dos indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva ou crônica. E posteriormente, Teixeira et al. (2006) verificaram que os sorotipos **b** e **c** foram mais prevalentes, estando o sorotipo **b** relacionado com saúde periodontal e o sorotipo **c** com periodontite crônica.

Assim, a realização do presente estudo, inicialmente de prevalência e subsequentemente de associação entre a expressão de leucotoxina e a produção de sorotipos em relação à ocorrência da doença periodontal precoce, agressiva ou crônica, em suas formas mais brandas ou exacerbadas, poderá nortear medidas de diagnóstico preventivo além de estabelecer medidas terapêuticas de acordo não somente com as características clínicas da doença, mas também com o perfil microbiano de *A. actinomycetemcomitans* do indivíduo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Uma das associações mais fortes entre um suposto patógeno e a doença periodontal destrutiva envolve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, renomeada em relação a antiga designação *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen & Kilian, 2006). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi primeiramente descrito em 1912 pelo microbiologista alemão Klinger em uma amostra de actinomicose cervicofacial, sendo denominado *Bacterium actinomycetum comitans*. Após algumas propostas de alteração na sua nomenclatura, esta bactéria foi denominada *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em 1929 por Topley e Wilson. O termo “*Actinobacillus*” foi empregado em função da característica de colônia. As células bacterianas medem de 0,5 a 1,0 μ m de diâmetro, e quando cultivados em meio de cultura sólido apresentam colônias convexas e translúcidas, apresentando em seu interior uma estrutura em forma de estrela. O emprego do termo “*actinomycetemcomitans*” está na similaridade existente com actinomicoses produzidas por *Actinomyces israeli* (Zambon, 1985).

A. actinomycetemcomitans é um bastonete gram-negativo, curto, não formador de esporos, imóvel e anaeróbio facultativo (Slots, 1982). *A. actinomycetemcomitans* tem demonstrado a capacidade de invadir as células epiteliais da gengiva humana in vitro (Blix et al., 1992; Sreenivasan et al., 1993), células endoteliais vasculares humanas (Schenkein et al., 2000) e células epiteliais bucais in vivo (Rudney et al., 2001). Além disso, estudos têm mostrado que *A. actinomycetemcomitans* induz a morte celular por apoptose (Arakawa et al., 2000; Kato et al., 2000).

Sugere-se que *A. actinomycetemcomitans* inicialmente colonize a cavidade bucal pela aderência às células epiteliais (Fine et al., 2006). Existe uma adesina protéica específica, Aae, que adere ao receptor carboidrato nas células epiteliais humanas e também de macacos do tipo “Velho Mundo”. Assim, *A. actinomycetemcomitans* move-se das células epiteliais bucais para a placa supragengival, possivelmente aderindo-se ao dente pela fímbria formada por subunidades repetidas de proteína (Fine et al. 2006). De forma alternativa, *A. actinomycetemcomitans* pode aderir-se a outras espécies bacterianas por coagregação (Kolenbrander, 2000). A partir de um determinado ponto estes organismos podem se mover da região supragengival para o ambiente subgengival. A partir deste ponto vantajoso, eles podem então se aderir ou evadir-se das camadas de células epiteliais da bolsa periodontal e possivelmente penetrar no tecido conjuntivo (Rudney et al., 2001). *A. actinomycetemcomitans* apresenta-se ainda na camada íntima das paredes dos vasos (Marques de Silva et al., 2005) e tem sido cultivado de lesões ateromatosas (Kozarov et al., 2005). Finalmente, *A. actinomycetemcomitans* pode deixar a cavidade bucal causando ou contribuindo para a ocorrência de endocardite, uma vez que este microrganismo está frequentemente presente em lesões dessa condição (Paturel et al., 2004).

Atualmente, *A. actinomycetemcomitans* é considerado um dos principais patógenos de origem bucal relacionado com doenças sistêmicas como diabetes (Kuroe et al., 2004), e sua detecção pode ser observada em diversas regiões do organismo (Kim et al., 2003).

Dentre os fatores de virulência de *A. actinomycetemcomitans*, podemos destacar a produção de leucotoxina com elevado potencial inflamatório. A leucotoxina produzida por *A. actinomycetemcomitans* pode inativar neutrófilos,

algumas linhagens de células T, B e macrófagos humanos, podendo ainda retardar a produção de anticorpos para a leucotoxina, comprometendo parcialmente a resposta do hospedeiro (Slots, 1997).

Inicialmente, três sorotipos do patógeno foram descritos (Zambon et al., 1983) **a**, **b** e **c**. Posteriormente, outros três sorotipos foram descritos, **d** e **e** (Saarela et al., 1992) e **f** (Kaplan et al., 2001). Diversidade genética e variações no potencial de virulência podem existir entre as cepas de *A. actinomycetemcomitans* (Henderson et al., 2003). A compreensão das suscetibilidades do hospedeiro em relação aos fatores microbianos é essencial para o sucesso do tratamento da doença periodontal

Diversos estudos têm evidenciado uma maior frequência de *A. actinomycetemcomitans* em lesões periodontais de indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva ou crônica quando comparados com controles saudáveis ou gengivite (Zambon et al., 1983; López et al., 1995; Haraszthy et al., 2000; Cortelli et al., 2005; Yang et al., 2005).

2.1 PREVALÊNCIA DE *A. actinomycetemcomitans*

Ashimoto et al. (1996) avaliaram cinquenta indivíduos diagnosticados com periodontite avançada, cinquenta indivíduos diagnosticados com periodontite crônica e cinquenta indivíduos diagnosticados com gengivite. Amostras do biofilme subgengival foram coletadas e analisadas pela técnica da reação em cadeia polimerase (PCR). Os resultados mostraram prevalência de *A.*

actinomycescomitans de 30% para indivíduos com periodontite avançada, 14% para indivíduos com periodontite crônica e de 14% para indivíduos saudáveis.

López (2000) avaliou a prevalência de *A. actinomycescomitans* em indivíduos com periodontite crônica verificando que 11,6% dos indivíduos analisados alojavam este microrganismo, não havendo associação entre *A. actinomycescomitans* e periodontite crônica na população estudada. Mullally et al. (2000) avaliaram a presença de diferentes patógenos em 41 indivíduos com periodontite agressiva. Por meio da técnica de PCR amostras do biofilme dental foram avaliadas mostrando prevalência de *A. actinomycescomitans* de 19%.

Hamlet et al. (2001) avaliaram a distribuição de *A. actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em uma população de 504 indivíduos australianos. Os autores encontraram amostras positivas de *A. actinomycescomitans* em 22,8% da população seguida de *P. gingivalis* (14,7%) e *P. intermedia* (9,5%).

Tan et al. (2001), na China, avaliaram 42 indivíduos com periodontite crônica moderada e avançada e cinquenta indivíduos saudáveis. A prevalência observada de *A. actinomycescomitans* foi de 74% para todo o grupo, quando vistos separadamente foi de 69% para indivíduos com periodontite crônica e de 78% para indivíduos saudáveis.

Haubek et al. (2002) verificaram a perda de inserção em indivíduos com periodontite agressiva e a presença de *A. actinomycescomitans* de máxima leucotoxicidade em amostras do biofilme. Observaram que a perda de inserção significativamente maior em indivíduos positivos para *A. actinomycescomitans* tipo JP2, de máxima leucotoxicidade, e prevalência de 38,5% de *A. actinomycescomitans* nos indivíduos observados.

Maida et al. (2003) determinaram a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* em uma população italiana com periodontite crônica, observaram a presença do microrganismo em 40,8% das amostras avaliadas. Takeuchi et al. (2003) examinando amostras subgengivais de indivíduos japoneses diagnosticados com periodontite agressiva a presença de *A. actinomycetemcomitans*, observaram o patógeno em 20% dos indivíduos com periodontite agressiva localizada e em 17,5% nos indivíduos com agressiva generalizada.

Gajardo et al. (2005) avaliaram a presença de oito periodonto patógenos em uma população chilena diagnosticada com periodontite agressiva e periodontite crônica. Os resultados mostraram que *A. actinomycetemcomitans* foi pouco prevalente nesta população, na qual a maior prevalência encontrada foi de *Campylobacter rectus*, mostrando ainda que a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* foi menor em indivíduos com periodontite agressiva localizada do que em indivíduos com periodontite crônica. Zhan et al. (2005) analisaram amostras do biofilme subgengival de 152 indivíduos diagnosticados com periodontite crônica leve, moderada e avançada e de trinta indivíduos saudáveis, e foi observada prevalência de 72,4% para indivíduos com periodontite crônica e de 6,7% para indivíduos saudáveis.

Feng et al. (2006) avaliaram a presença de microorganismos em 55 indivíduos com periodontite agressiva, relatando prevalência de 1,8% de *A. actinomycetemcomitans*. Ohnishi (2006) examinando indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva localizada e generalizada e periodontite crônica avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* na saliva e no sulco gengival. Os resultados mostraram que na saliva *A. actinomycetemcomitans* foi mais prevalente nos indivíduos com periodontite agressiva do que periodontite crônica, a prevalência

encontrada foi de 46,7% em indivíduos com periodontite agressiva localizada, 40% em indivíduos com periodontite agressiva generalizada e 14,3% em indivíduos com periodontite crônica.

Aimetti et al. (2007) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme subgengival de 33 pacientes com periodontite crônica avançada e foi observada prevalência de 33,3%.

Joshi & Vandana (2007) identificaram a presença de diferentes microrganismos, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, em sítios periodontais de indivíduos adultos indianos apresentando periodontite de progressão rápida comparados com indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram que *A. actinomycetemcomitans* esteve presente em 35% dos sítios doentes e em 37% dos sítios saudáveis.

Meng et al. (2007) avaliaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* em amostras subgengivais de 116 indivíduos diagnosticados com periodontite crônica e 111 diagnosticados indivíduos saudáveis. A prevalência do microrganismo foi de 33,62% em sítios doentes e de 0,9% nos sítios saudáveis, sendo o microrganismo envolvido na etiologia da periodontite crônica.

Lafaurie et al. (2007) avaliaram 325 indivíduos com periodontite crônica, 158 com periodontite agressiva e 137 saudáveis ou com gengivite. Dados demográficos, clínicos e amostras subgengivais foram coletadas e analisadas pela técnica de PCR. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* foi significativamente maior no grupo diagnosticado com periodontite agressiva quando comparados com os outros dois grupos (periodontite crônica e saudáveis). Ledder et al. (2007) examinaram periodonto patógenos em amostras subgengivais de 47 indivíduos diagnosticados com periodontite crônica e saudáveis. Verificaram prevalência de *A.*

actinomycetemcomitans de 16% em indivíduos doentes, sendo significativamente maior quando comparada com indivíduos saudáveis. Thiha et al. (2007) avaliaram a presença de periodonto patógenos em 32 indivíduos com periodontite crônica generalizada, 16 com periodontite agressiva generalizada e oito indivíduos com periodontite agressiva localizada. Verificaram prevalência de 63% para os indivíduos com periodontite agressiva localizada, 16% para periodontite crônica e 38% para periodontite agressiva generalizada.

Cortelli et al. (2008) examinando indivíduos com periodontite crônica leve/moderada e periodontite crônica avançada, observaram a prevalência deste microrganismo em 10,12% e de 26,6%, respectivamente. Rylev & Kilian (2008) avaliaram a prevalência e distribuição dos principais patógenos periodontais no mundo. Observaram que numerosos estudos relacionam *A. actinomycetemcomitans* com indivíduos saudáveis e nas diversas formas de periodontite, mas sua comparação requer cautela, pois diferentes grupos étnicos avaliados podem influenciar nos dados obtidos.

2.2 EXPRESSÃO DE LEUCOTOXINA E SOROTIPOS

A expressão leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* esta presente em todas as cepas, pois trata-se de uma característica genética, já a presença de sorotipos (de *a* a *f*) esta ligada ao fenótipo podendo haver cepas não identificadas pelos sorotipos (Paju et al., 1998; van der Reijden et al., 2008). *A. actinomycetemcomitans* expressa uma leucotoxina específica que promove a

destruição de linfócitos polimorfonucleares e monócitos humanos, mas é inativo contra outros tipos celulares (Kolodrubetz et al., 1989). A produção da leucotoxina é codificada na região do *operon*, composto de quatro genes dispostos de acordo com a ordem de transcrição da toxina, em C(ItxC), A (ItxA), B (ItxB) e D (ItxD). Ltx A é o gene estrutural e apresenta outras quatro distintas regiões: N-terminal, responsável pela interação celular com a membrana da célula alvo; região central, com conteúdo hidrofílico, região com agrupamentos de nove aminoácidos com tendência a repetição e uma região C-terminal, envolvida na translocação da toxina para a superfície celular bacteriana. Os genes ltx B, C e D são relacionados com a ativação e transporte da toxina (Lally et al., 1986).

A lise celular acontece pela formação de canais condutores de íons, que causam despolarização da membrana da célula alvo, aumentando a pressão osmótica com consequente passagem de líquido para o interior da célula (Fives-Taylor et al., 1999).

A marcada relação de *A. actinomycetemcomitans* com os envoltórios avançados de doença periodontal, induz a realização de estudos envolvendo seus fatores de virulência. Alguns autores atribuem ao *A. actinomycetemcomitans* a capacidade de induzir modificações patogênicas no biofilme dental através da produção de fímbrias, que favorecem o biofilme frente a resposta imunológica do hospedeiro (Inoue et al., 2003; Asakawa et al., 2003).

Zambon et al. (1996) realizaram uma avaliação microbiológica de indivíduos com periodontites de início precoce, buscando uma associação de elevada leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* com periodontite agressiva localizada. Para tanto, hibridização *dot blot* e PCR foram empregados em 165 isolados recentes de *A. actinomycetemcomitans*. Cepas de máxima leucotoxicidade foram encontradas

em 22% dos indivíduos. Os indivíduos portadores de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade eram mais jovens (média de idade 12,7 anos) do que os que apresentavam *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade (média de idade 25,5 anos). Indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva localizada apresentaram maior prevalência de cepas de máxima leucotoxicidade (57%) em comparação a indivíduos saudáveis ou diagnosticados com periodontite crônica. Diante dos dados obtidos, os autores destacaram a importância de se identificar e diferenciar cepas de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese de certos tipos de periodontites de início precoce e outras formas de doença periodontal de progressão rápida.

Haraszthy et al. (2000) avaliaram a importância da leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese da doença periodontal. Por meio da técnica de PCR foi possível diferenciar cepas de máxima e mínima leucotoxicidade, a partir de 1.023 isolados recentes por cultura bacteriana de 146 indivíduos, incluindo, 71 com periodontite agressiva localizada, quatro com periodontite de início precoce, 11 com periodontite pós-juvenil na forma localizada, 41 com periodontite do adulto e 19 indivíduos periodontalmente saudáveis. Cepas de máxima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* foram encontradas em 55% dos indivíduos com periodontite juvenil localizada e 50% em indivíduos com periodontite de início precoce. As referidas cepas acometeram mais frequentemente indivíduos jovens (média de idade de 13,95 anos), ao passo que cepas produtoras de mínima leucotoxicidade estiveram relacionadas a indivíduos de seis a 65 anos de idade (média de idade de 35-47 anos). Logo, cepas de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade foram mais frequentemente isolados de indivíduos diagnosticados com periodontite

agressiva localizada e periodontite de início precoce, sobretudo nos indivíduos jovens.

Haubek et al. (2001) associaram a presença de *A. actinomycetemcomitans*, de máxima leucotoxicidade, com periodontite de início precoce em crianças marroquinas. Para cada criança, duas amostras subgengivais de biofilme dental foram obtidas preferencialmente de molares e incisivos. *A. actinomycetemcomitans* foi avaliado através de cultura bacteriana em meio seletivo (TSBV) e PCR foi utilizada para avaliação da expressão de leucotoxina. Os resultados mostraram prevalência de 60,4% de *A. actinomycetemcomitans*, dos quais 14,5% foram produtoras de máxima leucotoxicidade. Após avaliação dos resultados, foi estabelecida associação entre expressão de leucotoxina e determinados envolvimento específicos de doença periodontal.

Kaplan et al. (2002) observaram em 33 cepas isoladas de *A. actinomycetemcomitans* sendo estas, vinte de indivíduos diagnosticados com periodontite juvenil localizada, quatro de indivíduos saudáveis e nove cepas de referencia (controles). Das 33 cepas, oito foram identificadas como de máxima leucotoxicidade sendo cinco de indivíduos com periodontite juvenil localizada, um de indivíduo saudável e duas de cepas de referência. Todas as cepas de máxima leucotoxicidade apresentaram sorotipo **b**.

Cortelli et al. (2003) propuseram a detecção de cepas de *A. actinomycetemcomitans*, de máxima e mínima leucotoxicidade. Nas amostras de biofilme dental subgengival, a expressão de leucotoxina foi avaliada através de PCR. *A. actinomycetemcomitans* foi isolado de 29,4% dos indivíduos avaliados, onde se observou relação estatística entre o diagnóstico periodontal e o resultado da cultura

bacteriana, presença de cepas de máxima leucotoxicidade e indivíduos com idade inferior a 28 anos e diagnosticados com periodontite agressiva.

Poulsen et al. (2003) avaliaram a detecção de cepas de máxima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme dental subgingival através da PCR. Os autores relacionam esta cepa, conhecida por sua máxima leucotoxicidade, a envolvimento de periodontite agressiva nas formas localizada e generalizada, bem como sua maior prevalência em indivíduos jovens. Destacam ainda, a importância da detecção diferencial dessa cepa no estabelecimento do diagnóstico precoce e tratamento das doenças periodontais agressivas.

Estudos indicam que indivíduos com lesões periodontais mais severas, ou seja, com evidente presença de perda de inserção conjuntiva e óssea alveolar apresentam maior probabilidade de serem colonizados por *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade enquanto clones de mínima leucotoxicidade se associam a indivíduos apresentando reduzida perda de inserção conjuntiva e óssea alveolar (DiRienzo et al., 1994; Haubek et al., 1997; Macheleidt et al., 1999; Haubek et al., 2001). Adicionalmente, clones de máxima leucotoxicidade são mais encontrados em indivíduos com descendência africana (Haubek et al., 1997; Contreras et al., 2000; Haraszthy et al., 2000); diagnosticados com periodontites de início precoce (Haubek et al., 1997, 2001; Haraszthy et al. 2000); indivíduos adolescentes com destacada perda de inserção clínica (Haubek et al., 2002) ou ainda, que a colonização intra-familiar destes clones sugere a ocorrência de transmissão entre membros de uma mesma família (Haubek et al., 2007). Cepas de máxima leucotoxicidade compõem aproximadamente metade das cepas isoladas de africanos e afro americanos, mas apenas de 0-2% das cepas isoladas de europeus e asiáticos (Haubeck et al. 1995, 1997; Haraszthy et al., 2000).

Além disso, amostras de *A. actinomycetemcomitans* podem ser classificadas de acordo com a expressão fenotípica de antígenos sorotipos-específicos. Os encontrados em amostras de *A. actinomycetemcomitans* são os sorotipos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** (Zambon et al., 1983; Chung et al., 1989; Saarela et al., 1992; Gmür et al., 1993; Haubek et al., 1997; Tinoco et al., 1997; Saarela et al., 1999; Kaplan et al., 2001, 2002). O sorotipo é determinado por antígenos relacionados a lipopolissacarídeos presentes na superfície celular (Paju et al., 1998) e aparentemente todos têm potencial patogênico (Kaplan et al., 2002).

Zambon et al. (1983) identificaram três diferentes sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, observando indivíduos sorotipos **a** e **b** em igual proporção e distribuição e sorotipo **c** menos frequente, concluíram que sorotipos **a** e **b** são encontrados em indivíduos saudáveis e doentes em igual proporção indicando que nenhum desses sorotipos tem vantagem na colonização inicial de sítios periodontais.

Algumas estruturas presentes na membrana celular podem levar a uma resposta antiinflamatória específica, a resposta do hospedeiro não é restrita a uma única cepa bacteriana, mas podem ser induzidas por um grupo distinto de uma única espécie. Muitos sujeitos apresentam apenas um único sorotipo, que pode ficar estável por muitos anos (Asikainen et al., 1991; Saarela et al., 1992), ocasionalmente indivíduos são colonizados por dois ou mais sorotipos. Apesar da diversidade de sorotipos encontrados cepas de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos caucasianos um único sorotipo geralmente é encontrado (67-80%) colonizando a cavidade oral (Asikainen et al., 1995), e este sorotipo tende persistir na cavidade oral por anos (Saarela et al., 1999). Resultados controversos foram observados em populações com outra origem geográfica. Nos população japonesa um único sorotipo de *A. actinomycetemcomitans* é observado entre 52 % (Yoshida et

al., 2003) e 95% (Yamamoto et al., 1997) dos indivíduos, dependendo do método de sorotipagem utilizado. Na população tailandesa (Yang et al., 2005) e chinesa (Mombelli et al., 1999), entre 80-85% da população apresenta um único sorotipo.

Aproximadamente de 3% a 9% das cepas de *A. actinomycetemcomitans* não são sorotipáveis, mesmo analisadas por diferentes técnicas. A extração do DNA genômico por PCR detecta sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* mais sensivelmente que a sorotipagem por métodos sorológicos (Suzuki et al., 2001).

Alguns estudos mostram que existe considerável variação genética entre as cepas de *A. actinomycetemcomitans* e indicam que deve existir variação no potencial de virulência. Estudos de distribuição dos sorotipos mostram os sorotipos **a** e **b** frequentemente isolados de pacientes com periodontite juvenil localizada, sorotipo **c** mais comum em indivíduos saudáveis e sorotipos **d**, **e** e **f** raramente encontrados (Zambon et al., 1983; Haubeck et al., 1995; Paju et al., 2000).

A presença de tal diversidade de sorotipos pode estar associada ao perfil periodontal dos pacientes examinados e a diferentes regiões onde as populações alvo são alocadas nos diferentes estudos. Basicamente na população brasileira apenas dois estudos avaliando a presença de sorotipos foram realizados, o primeiro conduzido por Tinoco et al. (1997) onde examinaram a presença dos sorotipos **a**, **b**, **c** em 28 indivíduos com doença periodontal e oito indivíduos como controles saudáveis, observaram a prevalência do sorotipo **c** em indivíduos doentes, e outro desenvolvido por Teixeira et al. (2006) avaliaram a presença dos sorotipos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** em amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de 38 indivíduos com periodontite agressiva ou crônica e 11 saudáveis e observaram a prevalência do sorotipo **b** em indivíduos saudáveis e sorotipo **c** em indivíduos com periodontite crônica.

A distribuição global dos diferentes sorotipos não é homogênea e é dependente da localização geográfica e status étnico da população estudada. Na Finlândia, Suécia e Dinamarca sorotipos **a**, **b** e **c** são observados em iguais proporções (Saarela et al., 1992; Haubeck et al., 1997). Estudos mostram a prevalência do sorotipo **c** em chineses, japoneses, vietnamitas, e coreanos (Chung et al., 1989; Holtta et al., 1994; Mombelli et al., 1998, 1999; Yoshida et al., 2003; Thiha et al., 2007). Gmur & Baehni (1997) demonstraram a diversidade dos sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em grupos étnico heterogêneo observando a frequência de sete indivíduos sorotipo **a**, 11 indivíduos sorotipo **b**, seis indivíduos sorotipo **c**, quatro indivíduos sorotipo **d**, quatro indivíduos sorotipo **e**.

Laiko et al. (2002) avaliaram a relação entre os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* e a proporção do microrganismo na microflora subgengival. Diviram os indivíduos em três grupos: (1) baixa proporção de *A. actinomycetemcomitans*; (2) media proporção de *A. actinomycetemcomitans*; (3) alta proporção de *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados mostraram sorotipo **b** significativamente mais prevalente nos indivíduos com alta proporção do microrganismo. Também foi encontrada significante prevalência do sorotipo **c**, mas em indivíduos com baixa proporção de *A. actinomycetemcomitans*. Concluíram que o sorotipo **c** esta relacionado com saúde periodontal e sorotipo **b** parece ser mais destrutivo que outros sorotipos pode multiplicar-se em altas proporções na bolsa periodontal.

Haubeck et al. (1995) observaram a leucotoxicidade e sorotipos de 88 cepas de *A. actinomycetemcomitans* oriundas da Finlândia sendo, 56 de indivíduos com periodontite de adulto, 16 de indivíduos com periodontite juvenil localizada e de 16 indivíduos saudáveis ou com leve gengivite. Os resultados mostraram sorotipo **c**

mais prevalente em indivíduos saudáveis, sorotipos **a** e **b** mais prevalentes em indivíduos com periodontite juvenil localizada e sorotipos **a**, **b** e **c** equivalentes em indivíduos com periodontite de adulto. Observaram também dez cepas não sorotipadas. Quanto à leucotoxicidade, nenhuma das cepas avaliadas apresentou máxima leucotoxicidade não podendo ser relacionada com o estado da doença.

Brogan et al. (1994) avaliaram 97 cepas de *A. actinomycetemcomitans* originárias dos Estados Unidos e da Europa, e detectaram apenas duas cepas de máxima leucotoxicidade ambas originárias da população americana, suportando a hipótese que diferentes situações epidemiológicas podem existir entre europeus e americanos.

Fine et al. (2007) observaram 1075 indivíduos afro americanos e hispânicos com idade entre dez e 17 anos, incluíram no estudo 38 infectados por *A. actinomycetemcomitans* (36 saudáveis e dois com doença periodontal) e 58 indivíduos saudáveis e não infectados. Os resultados mostraram perda de inserção em oito dos 38 indivíduos com *A. actinomycetemcomitans*; nenhum dos 58 saudáveis apresentaram perda de inserção ou óssea. Os resultados mostraram igual distribuição dos sorotipos **a**, **b** e **c** em indivíduos africanos e uma maior predominância do sorotipo **c** em indivíduos hispânicos. Concluíram que indivíduos sem *A. actinomycetemcomitans* apresentam chance significativa de permanecerem saudáveis ao longo do tempo quando comparados com indivíduos infectados que durante o estudo já apresentaram perda de inserção. Quanto à leucotoxicidade apenas sete indivíduos foram positivos para máxima leucotoxicidade, sendo que destes, cinco apresentaram perda de inserção durante o estudo. Concluindo que cepas JP2 de máxima leucotoxicidade não são mais ou menos virulentas que outras cepas.

van der Reijden et al. (2008) avaliaram a distribuição e estabilidade de sorotipos de *A. actinomycetemcomitans* em 24 indivíduos sem tratamento periodontal em dois momentos, um inicial e após oito anos. Em 1994, observaram prevalência do sorotipo **b** (53,7%), e sorotipos **a** (17,1%), **c** (14,6%) e **e** (2,4%), não detectando os sorotipos **d** e **f**. Multiplicidade de sorotipos foi verificada em em 12,2% dos indivíduos. Em 2002, houve redução na prevalência do sorotipo **b** (30,2%) e sorotipo **a** (7,5%), o sorotipo **c** apresentou aumento (35,8%) bem como o sorotipo **e** (9,4%). O mesmo sorotipo foi verificado em 14 indivíduos (58,3%), em dez indivíduos houve mudança completa na distribuição dos sorotipos (41,7%). Não observaram relação entre o grau de destruição periodontal e a presença de um determinado sorotipo.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar simultaneamente a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, a expressão de leucotoxina de máxima (JP2) e mínima (652) e a presença dos sorotipos **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f** na população incluída no estudo relacionando com a condição periodontal.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Identificar a existência de co-infecção em um mesmo indivíduo por múltiplos sorotipos e/ou por mais de um padrão leucotóxico.

Relacionar o fator idade e gênero com as amostras de máxima e mínima leucotoxicidade e com os sorotipos.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram alocados no presente estudo transversal 764 indivíduos adultos que buscaram tratamento clínico periodontal nas clínicas de graduação e pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté nos anos de 2006-2008. Os indivíduos incluídos foram classificados em: periodontite incipiente (Tanner et al., 1998), periodontite crônica 1, 2 e 3 (Cortelli et al., 2008) e periodontite agressiva (Nibali et al., 2008). Destes foram positivos para *A. actinomycetemcomitans* trinta indivíduos diagnosticados com periodontite incipiente, 42 indivíduos com periodontite crônica 1, 15 indivíduos com periodontite crônica 2, 12 indivíduos com periodontite crônica 3 e 17 indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva.

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram avaliados durante a realização da anamnese, os dados demográficos populacionais além das condições de saúde geral e dental da população estudada. Para cada participante, foi explicado o objetivo do estudo, cujo projeto de pesquisa foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNITAU (CEP nº

390/07) e todos os participantes tiveram acesso a carta de informação (ANEXO A) e os que concordaram em participar o fizeram por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONDIÇÃO CLÍNICA PERIODONTAL

Os pacientes foram avaliados por um periodontista previamente treinado e calibrado. Da amostra, 10% foram examinados duas vezes para cada um dos critérios clínicos, a fim de se obter a confiabilidade diagnóstica intra-examinador aferida pela estatística Kappa (entre 0.8 e 1.0). No exame clínico periodontal foram obtidas mensurações para profundidade de sondagem e nível clínico de inserção realizadas em seis pontos por dente: mesio vestibular, médio vestibular, disto vestibular, mesio lingual/palatino, médio lingual/palatino, disto lingual/palatino, utilizando sonda periodontal manual (PCPUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, USA). Para Índice de Placa e Índice Gengival (Aainamo & Bay, 1975), avaliação foi realizada nas faces: vestibular, mesial, distal e lingual/ palatina. As mensurações observadas foram relacionadas em ficha clínica periodontal própria (ANEXO C), e exame radiográfico inter-proximal, foi realizado nos indivíduos diagnosticados clinicamente com periodontite, para estabelecer a altura da crista óssea alveolar.

4.4 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

A condição periodontal foi determinada no exame clínico, de acordo com os critérios pré estabelecidos pelos seguintes estudos: Tanner et al. (1998, 2005, 2006), Cortelli et al. (2008) e Nibali et al. (2008). Foram incluídos no estudo indivíduos que apresentaram condições de periodontite incipiente (Tanner et al., 1998, 2005, 2006), indivíduos diagnosticados com periodontite crônica 1, 2 e 3 (Cortelli et al., 2008) e indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva (Nibali et al., 2008).

Foram denominados indivíduos com periodontite incipiente aqueles que apresentaram média de perda de inserção clínica menor que 1,5mm e somente um sítio com perda de inserção de 2mm, e aqueles que apresentaram média de perda de inserção maior que 1,5mm e menor ou igual a 2mm.

Indivíduos com periodontite crônica 1, foram aqueles que apresentarem média de perda de inserção maior que 2mm e menor que 3mm. Periodontite crônica 2 aqueles que apresentaram média de perda de inserção maior ou igual a 3mm e menor que 5mm e periodontite crônica 3, indivíduos com média de perda de inserção maior ou igual a 5mm.

A determinação de periodontite crônica 1, 2 e 3 foi baseada em estudos prévios e dados anexados (ANEXO D).

Nos indivíduos com até 35 anos de idade, apresentando aspecto clínico periodontal compatível com saúde, todavia com perdas ósseas angulares evidenciadas radiograficamente, adicionalmente apresentando profundidade de sondagem ≥ 5 mm associada a perda de inserção clínica ≥ 4 mm nos primeiros

molares e incisivos centrais, foram diagnosticados como portadores de periodontite agressiva (Nibali et al., 2008).

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os indivíduos:

- a) submetidos à terapia periodontal 12 meses antecedentes ao início do estudo;
- b) submetidos a antibioticoterapia tres meses antecedentes ao início do estudo (Thiha et al., 2007);
- c) os que necessitaram de profilaxia antibiótica para a realização de exame clínico periodontal;
- d) os que não apresentaram no mínimo seis dentes dentre os oito preconizados para coleta (16, 11, 21, 26, 36, 31, 41, 46).

4.6 SÍTIOS E MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS

Dentre os pacientes examinados, 764 indivíduos atenderam os critérios de inclusão e as amostras bacterianas foram coletadas do sulco gengival / bolsa periodontal por meio de cones de papel autoclavado n° 30 (Dentsply, USA), das

faces com maior perda de inserção de pelo menos seis dos dentes índices (16, 11, 21, 26, 36, 31, 41 e 46).

Quando da coleta, cada dente selecionado foi previamente isolado com roletes de gaze esterilizada e o biofilme dental supra gengival removido com curetas periodontais esterilizadas. O cone de papel foi então inserido na porção mais apical do sulco gengival / bolsa periodontal e aí mantido por sessenta segundos (Roman-Torres et al., 2006). A partir de então, os seis cones de papel foram colocados em um único microtubo contendo 1,5mL de Ringer tampão TE e mantidos a -20°C até o seu processamento.

4.7 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.7.1 Extração de DNA genômico

Para o procedimento de extração do DNA genômico, os microtubos (contendo os cones de papel) foram homogeneizados em agitador mecânico por trinta segundos (Vortex , Phoenix, AP56). Após esta etapa, trezentos μ L de cada amostra foi transferido para um novo microtubo previamente identificado, e este foi submetido à centrifugação por dez minutos (4690X/g). Ao término do processo de centrifugação, o sobrenadante foi removido e 200 μ L de matriz comercial de extração e purificação de DNA (Instagene, Bio-Rad) foram adicionados ao *pellet* formado.

Após homogeneização por 15 segundos, o microtubo foi mantido em banho-maria por trinta minutos a 56°C. Em seguida, o microtubo foi novamente homogeneizado por trinta segundos e então mantido por oito minutos em banho-maria a 100°C. Ao término deste período, o final do processo de extração e purificação foi concluído pela homogeneização por trinta segundos e centrifugação por quatro minutos (4690X/g).

Com a finalidade de verificar a presença de DNA bacteriano nas amostras extraídas e se este se apresentava apto a ser amplificado, todas as amostras foram amplificadas com um par de *primers* (Invitrogen®) específico para o gene da beta-actina humana (P1 5'CGTGACATCAAAGAGAAGCTGTGC3' e P2 5'CAGGAGGAGCAATGATCTTGA3').

4.7.2 Detecção de *A. actinomycetemcomitans*, identificação dos genótipos JP2 e 652 e sorotipos por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras positivas para o gene da beta-actina humana ao processo de amplificação do DNA foram direcionadas por meio de pares de *primers* específicos ao gene rRNA 16S de *A. actinomycetemcomitans*-5'AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC3' e 5'ATGCCAACTTGACGTAAAT3' (Figura 1).

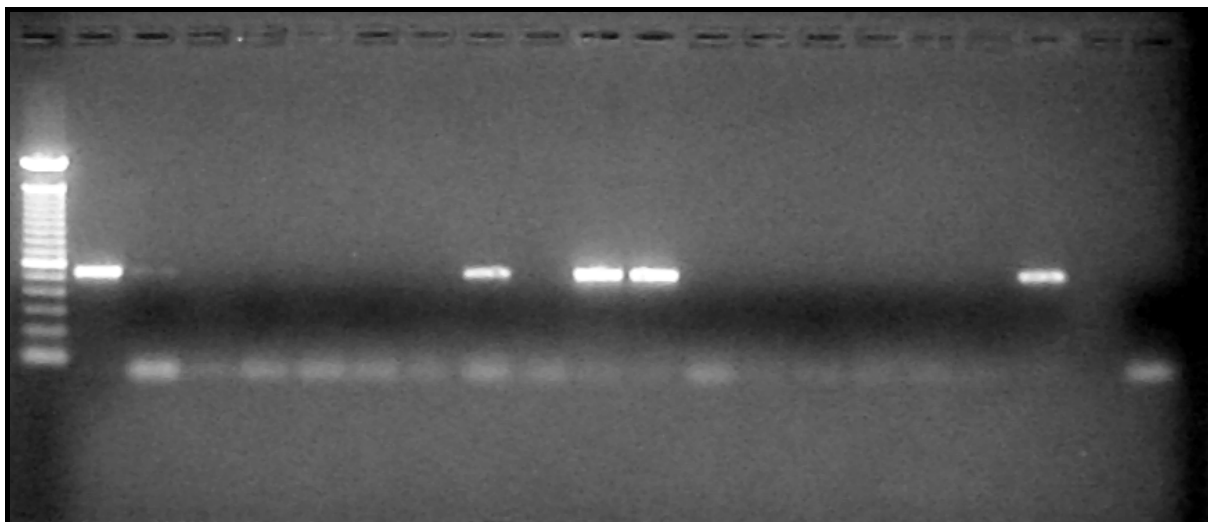


Figura 1-Identificação ao gene rRNA 16S de *A. actinomycetemcomitans*

Para o procedimento de identificação dos genótipos JP2 - Máxima leucotoxicidade (Acesso Genebank: M27399) e 652 - Mínima leucotoxicidade (Acesso Genebank: S68133) foram utilizados os *primers* (*Forward* 5'-CATTCTCGGCGAAAAACTA-3' e *Reverse* 5'-CCCATAACCAAGCCACATAC-3') desenhados de forma a circunscrever o fragmento de 530bp presente no genótipo 652, mas ausente no genótipo JP2. Dessa forma, os produtos amplificados esperados foram de 696bp (genótipo 652, mínima leucotoxicidade) e 195bp (genótipo JP2, máxima leucotoxicidade) (Figura 2).

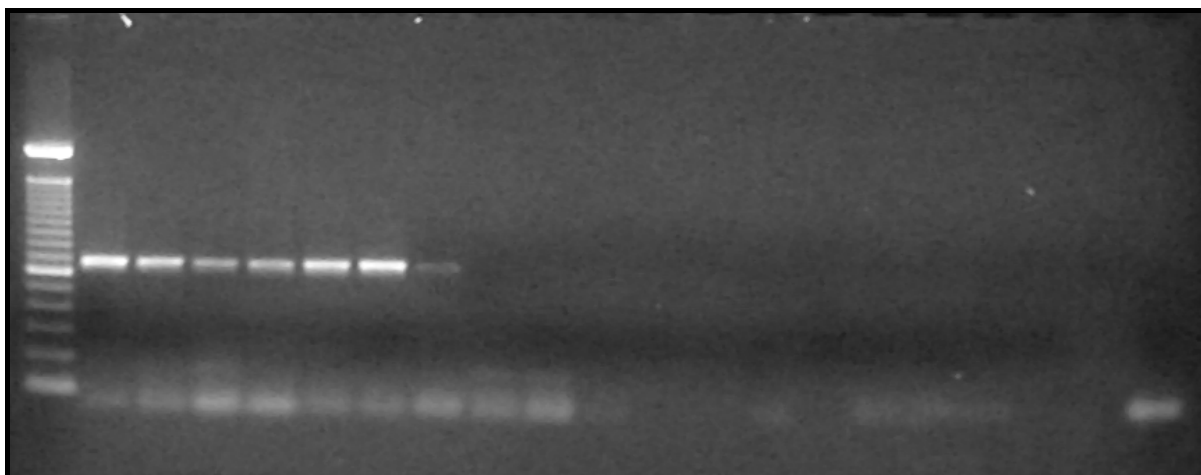


Figura 2-Identificação dos genótipos JP2 - Máxima leucotoxicidade (Acesso Genebank: M27399) e 652 - Mínima leucotoxicidade (Acesso Genebank: S68133)

A PCR foi realizada em termociclador tipo Mastercycler Gradient (Eppendorf) na seguinte condição: um ciclo inicial a 95°C/cinco minutos, 35 ciclos 95°C/trinta segundos, 55°C/trinta segundos, 72°C/um minuto, e um ciclo final de 72°C/cinco minutos.

Para a análise dos produtos amplificados pela PCR foi empregada eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR Safe™ (Invitrogen®). A eletroforese foi conduzida a 5V/cm² em solução tamponada (TAE) por sessenta minutos. A visualização dos produtos gerados pela amplificação pela PCR foi realizada em câmara de irradiação ultravioleta (UV). Marcador de peso molecular (Ladder 100 – Invitrogen), bem como, controles positivos e negativos foram empregados em todos os géis, para a confirmação dos resultados obtidos pela PCR. Os géis foram fotografados e comparados com os produtos amplificados a partir de cepas padrão.

A identificação dos sorotipos (Figura 3) foi realizada por meio da sequência dos *primers* para cada sorotipo e apresentados na Figura 4.

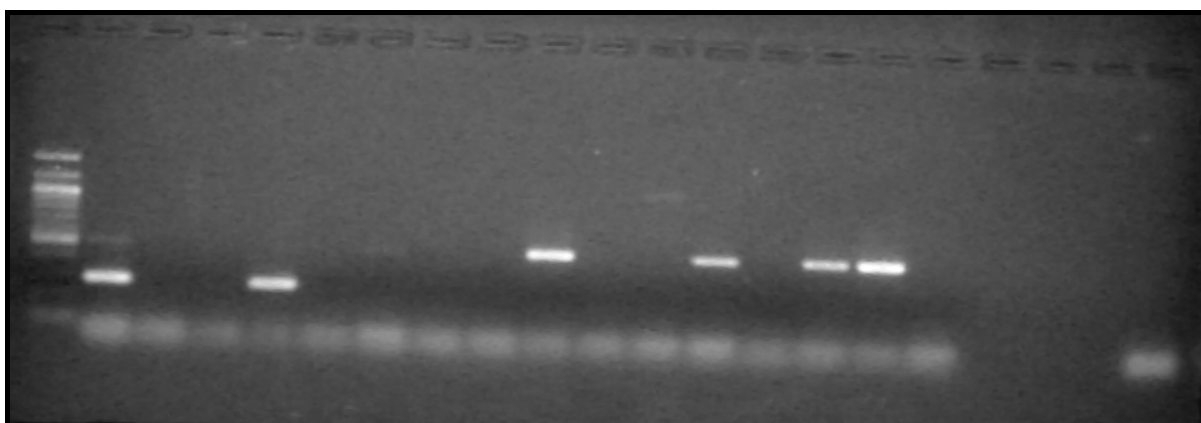


Figura 3-Identificação dos sorotipos **b** e **c**

sorotipos <i>A. actinomycetemcomitans</i>	Primer
Sorotipo a	For GCAATGATGTATTGTCTTCTTTTGGA Rev CTTCAGTTGAATGGGGATTGACTAAAAC
Sorotipo b	For CGGAAATGGAATGCTTGC Rev CTGAGGAAGCCTAGCAAT
Sorotipo c	For AATGACTGCTGTCCGGAGT Rev CGCTGAAGGTAATGTCA
Sorotipo d	For TTACCAGGTGTCTAGTCGGA Rev GGCTCCTGACAACATTGGAT
Sorotipo e	For CGTAAGCAGAAGAATAGTAAACGT Rev AATAACGATGGCACATCAGACTTT
Sorotipo f	For ARAAYTTYTCWTCGGGAATG Rev CCTTTATCAATCCAGACAGC

Figura 4-Sequência de primers utilizados

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após completa tabulação dos dados microbiológicos e clínicos envolvidos no presente estudo, os mesmos foram submetidos a tratamento estatístico específico com o auxílio dos softwares estatísticos Bio Estat 5.0 e SPSS 11.0. Em todas as situações de análise foi adotado nível de significância estatística de 95% ($\alpha=0,05$).

Para cada situação de análise de interesse a ser testada, tabelas de contingência 2X2 foram construídas e o teste estatístico Qui-quadrado (X^2) foi aplicado.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no presente estudo 764 indivíduos (31.4 ± 12.64 anos de idade), sendo trezentos indivíduos com Periodontite Incipiente, 262 Periodontite Crônica 1, 79 Periodontite Crônica 2, 52 Periodontite Crônica 3 e 71 Periodontite Agressiva (Tabela 1). Desse total, 116 apresentaram amostras subgengivais positivas para *A. actinomycetemcomitans* (Tabela 2).

Inicialmente, a distribuição de prevalência de acordo com o estado periodontal: periodontite incipiente, periodontite crônica 1, 2 e 3 e periodontite agressiva mostrou diferença significativa entre os indivíduos diagnosticados com periodontite incipiente e os demais classificados (Figura 1). Para todas as amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, foi realizada a sorotipagem (Figura 2), bem como o padrão de expressão leucotóxica (Figura 3). Os sorotipos **c** e **a** foram os mais frequentes ($p < 0,05$), seguidos pelo sorotipo **b**. Foram observadas cinco amostras não sorotipadas, além de co-infecção pelos sorotipos **a** e **b** em dois casos e **a** e **c** em nove casos (Figura 2). A avaliação da expressão de leucotoxina das amostras mostrou maior prevalência ($p < 0,05$) de cepas de mínima leucotoxicidade (Figura 3).

Ainda sem distribuir as amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* de acordo com o diagnóstico clínico periodontal dos indivíduos, foi proposta uma avaliação da frequência dos sorotipos de acordo com a idade (Figura 4) e gênero (Figura 5) dos indivíduos. Em ambas as avaliações, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Posteriormente, as amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans* foram separadas de acordo com a característica clínica periodontal dos indivíduos, a saber: Periodontite Incipiente, Periodontite Crônica 1, Periodontite Crônica 2, Periodontite Crônica 3 e Periodontite Agressiva (Figuras 6 a 10).

Para os indivíduos portadores de Periodontite Incipiente, os sorotipos **a** (18 casos) e **c** (11 casos) foram os mais ($p < 0,05$) prevalentes, seguidos pelos demais sorotipos que não estiveram presentes nessa população (Figura 6).

Nos portadores de Periodontite Crônica 1 com amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, o sorotipo **c** (26 casos) apresentou a maior prevalência ($p < 0,05$), seguido pelo sorotipo **a** (14 casos) e posteriormente pelos sorotipos **b** (três casos), **d** (zero caso), **e** (um caso), e **f** (zero caso) com prevalências equivalentes (Figura 7).

Para as amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* dos indivíduos portadores de Periodontite Crônica 2, os sorotipos **a** (seis casos) e **c** (sete casos) mostraram-se mais frequentes ($p < 0,05$), seguidos pelos sorotipos **b** (um caso), **d** (zero caso), **e** (um caso) e **f** (zero caso) que apresentaram prevalência similar (Figura 8).

Similarmente, nos indivíduos portadores de Periodontite Crônica 3, os sorotipos **a** (cinco casos) e **c** (cinco casos) mostraram-se mais frequentes ($p < 0,05$), seguido pelo sorotipo **b** (quatro casos) e pelos sorotipos **d** (zero caso), **e** (um caso) e **f** (zero caso) que apresentaram frequência equivalente (Figura 9).

Finalmente, nos indivíduos portadores de Periodontite Agressiva, comportamento diferente foi observado na sorotipagem das amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans*, onde o sorotipo mais prevalente ($p < 0,05$) foi o **b** (oito casos), seguido pelo **c** (seis casos) e posteriormente pelos sorotipos **a** (quatro

casos), **d** (zero caso), **e** (zero caso) e **f** (zero caso) que apresentaram frequência similar (Figura 10).

Tabela 1–Prevalência de *A. actinomycetemcomitans*

	PI	PC1	PC2	PC3	PA	TOTAL
Avaliados	300	262	79	52	71	764
Positivos	30	42	15	12	17	116
Prevalência	10%	16%	19%	23%	24%	15%

PI-periodontite incipiente; PC1-periodontite crônica 1; PC2-periodontite crônica 2; PC3-periodontite crônica 3; PA-periodontite agressiva

Tabela 2– Distribuição da população estudada

	PI	PC1	PC2	PC3	PA	TOTAL
Masculino	10	18	6	7	6	47
Feminino	20	24	9	5	11	69
Total	30	42	15	12	17	116
MI	27,10	33,42	32,66	44,00	28,88	32,10
±DP	±10,32	±10,97	±10,64	±12,87	±7,26	±11,50

MI – Média de Idade; DP – Desvio Padrão

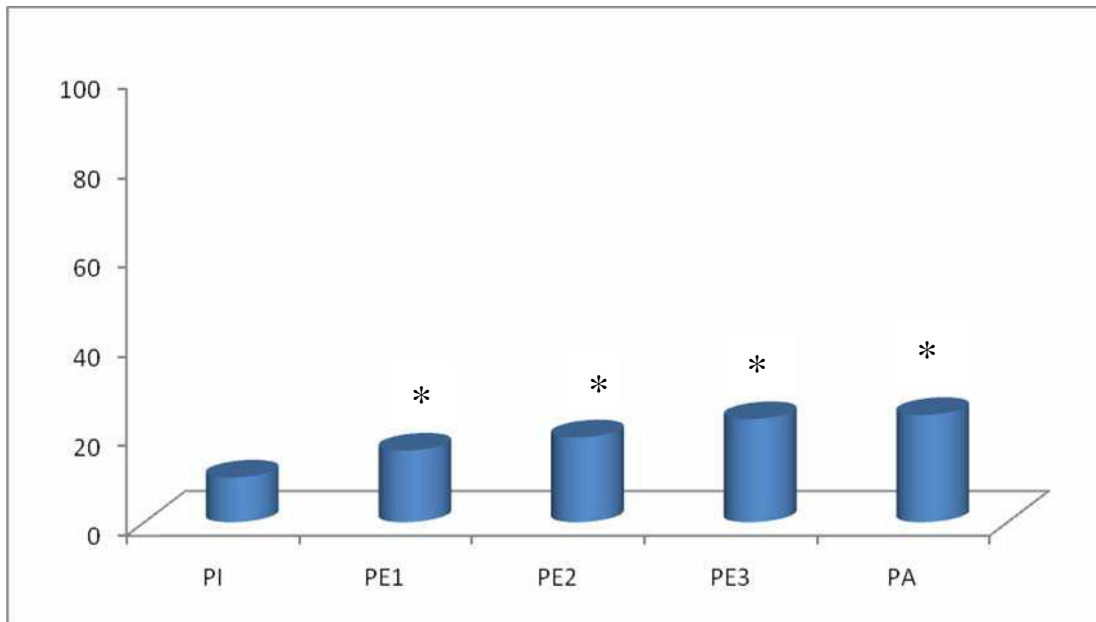


Figura 1-Distribuição da frequência de *A. actinomycetemcomitans* na população estudada

* -Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

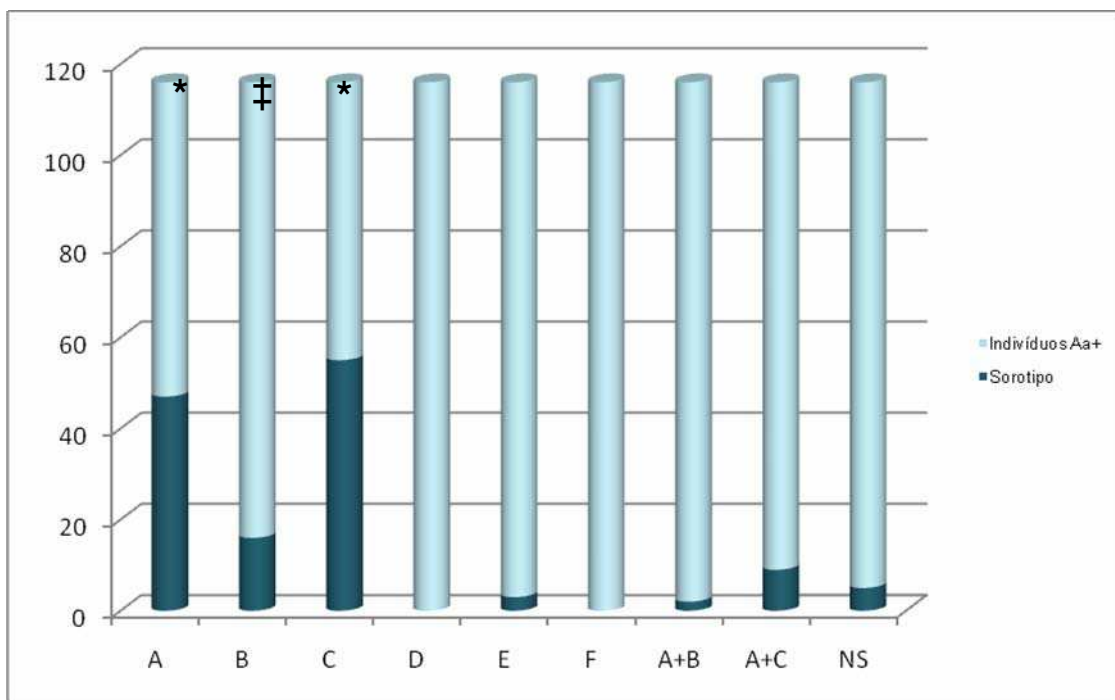


Figura 2-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos

*, ‡ - Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

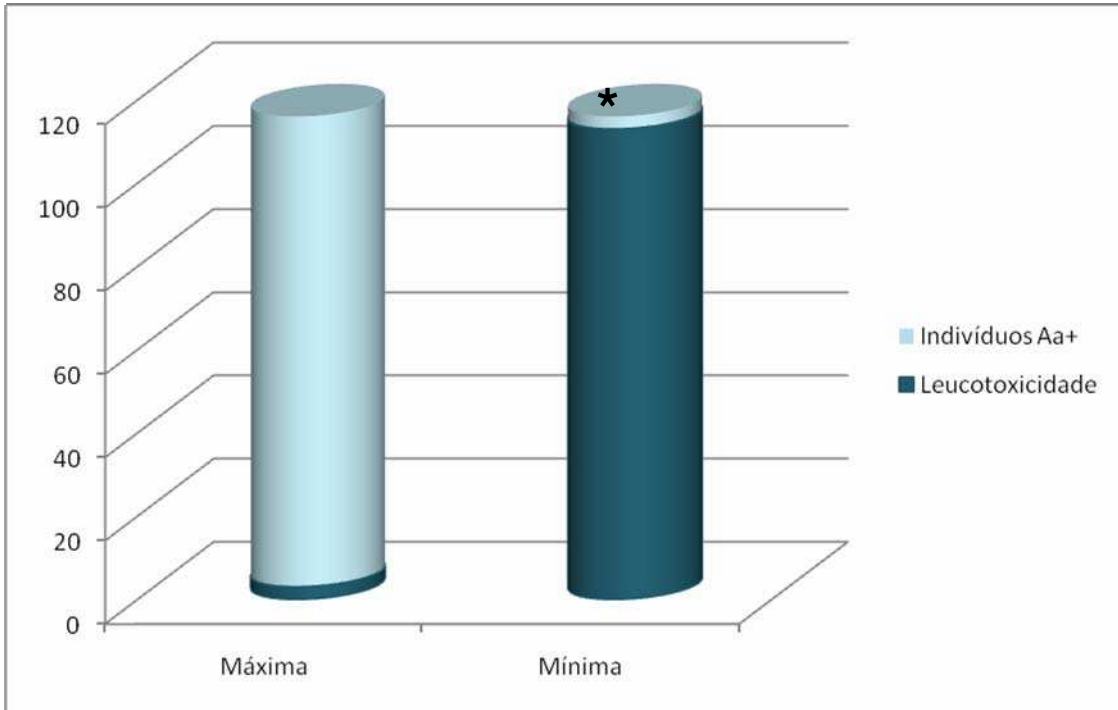


Figura 3-Distribuição da frequência de detecção de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade

*- Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

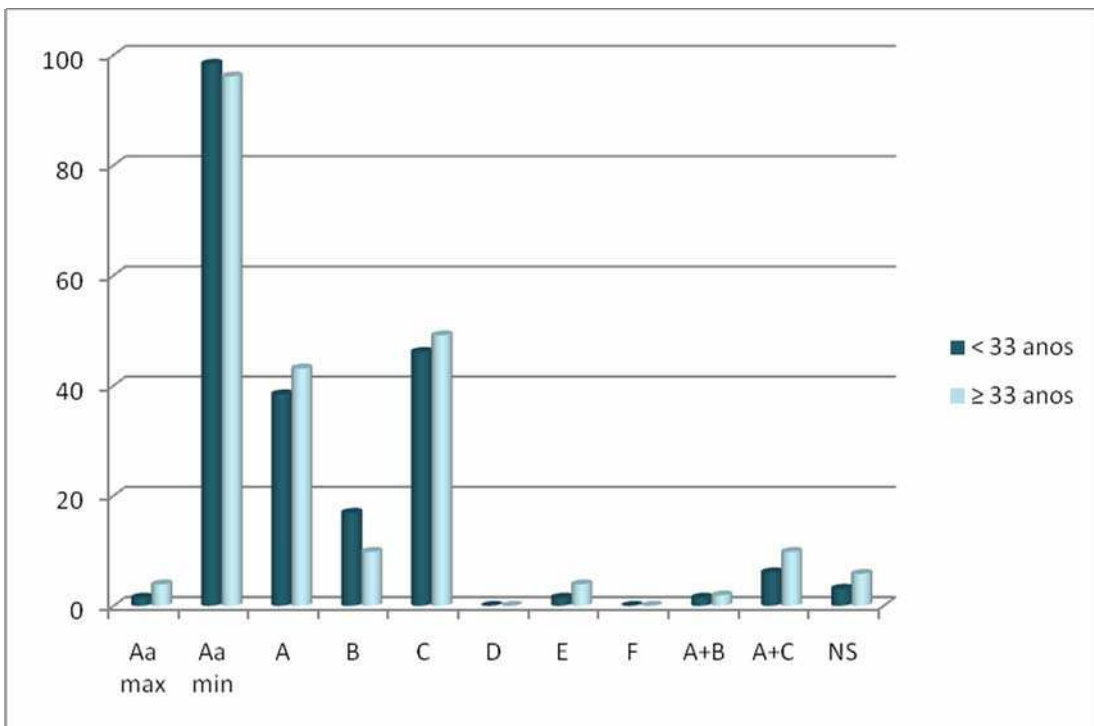


Figura 4-Distribuição da frequência de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade e sorotipos de *A.actinomycescomitans* de acordo com a faixa etária dos indivíduos

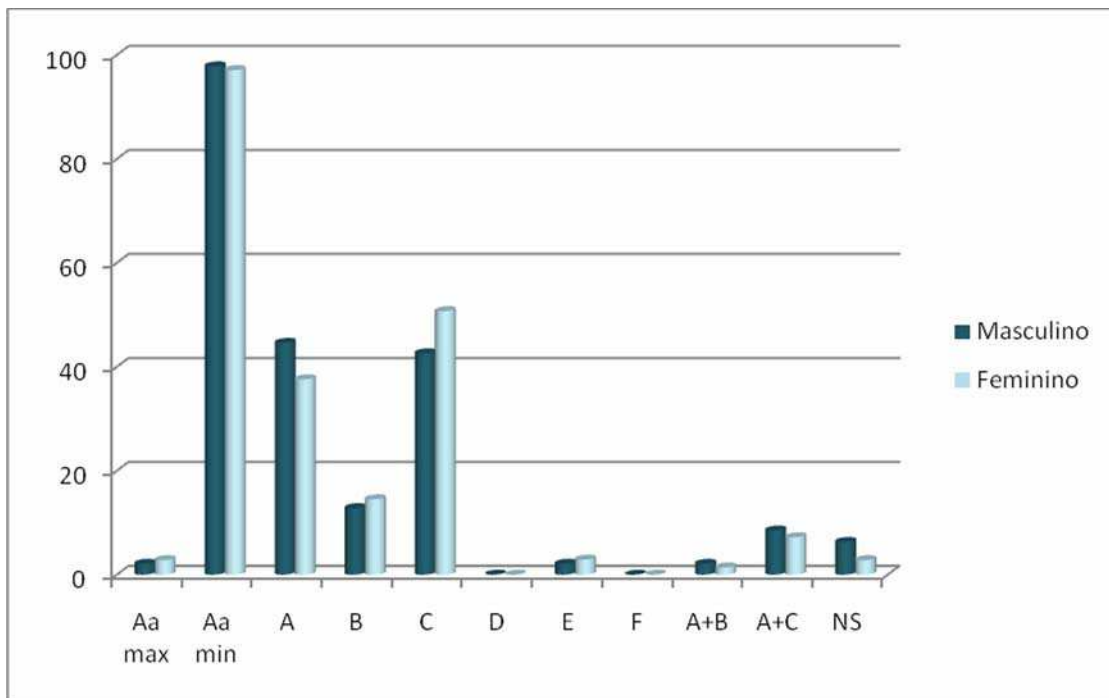


Figura 5-Distribuição da frequência de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade e sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* de acordo com o gênero dos indivíduos

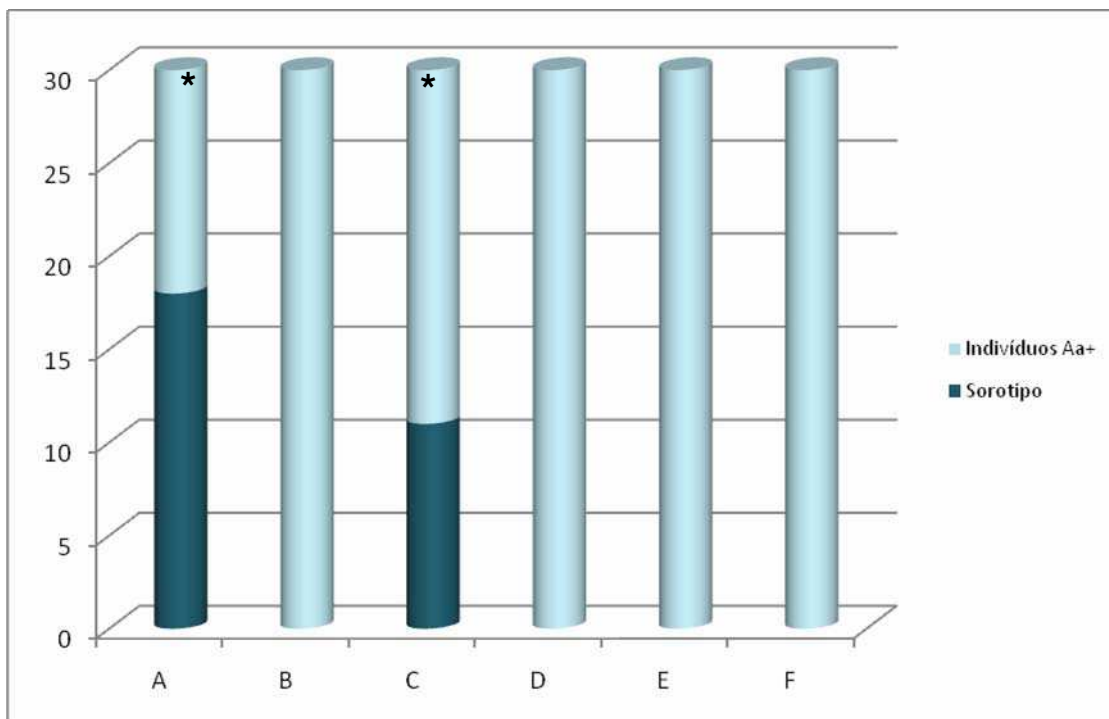


Figura 6-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* nos indivíduos diagnosticados com periodontite incipiente

* - Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

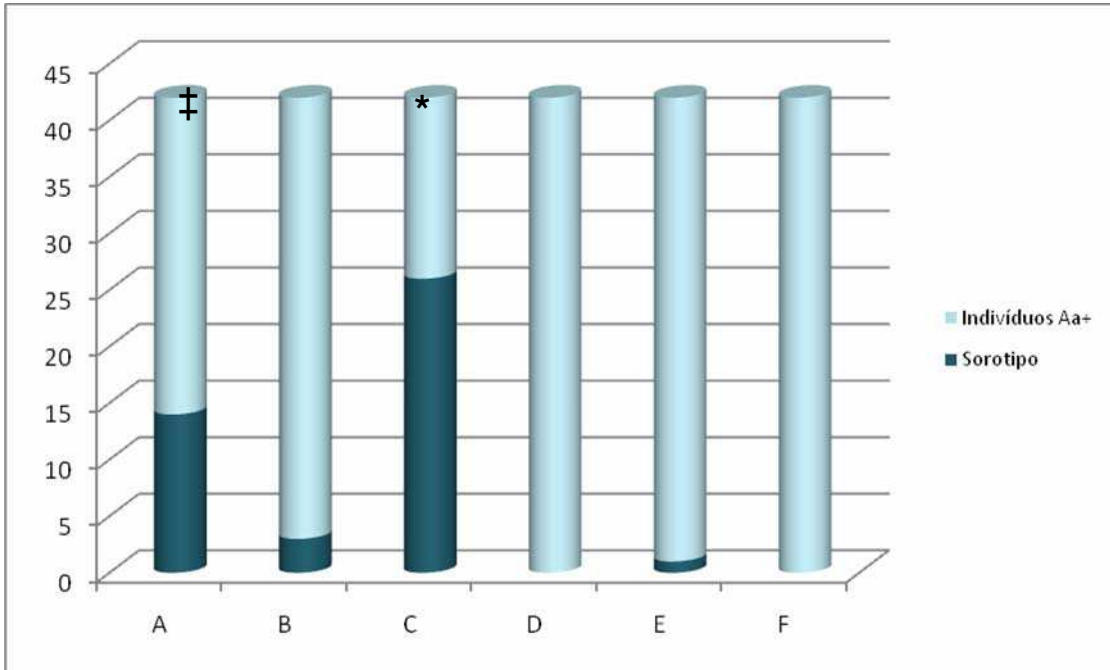


Figura 7-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* nos indivíduos diagnosticados com periodontite crônica 1
*, ‡ - Teste Qui-quadrado ($p<0.05$)

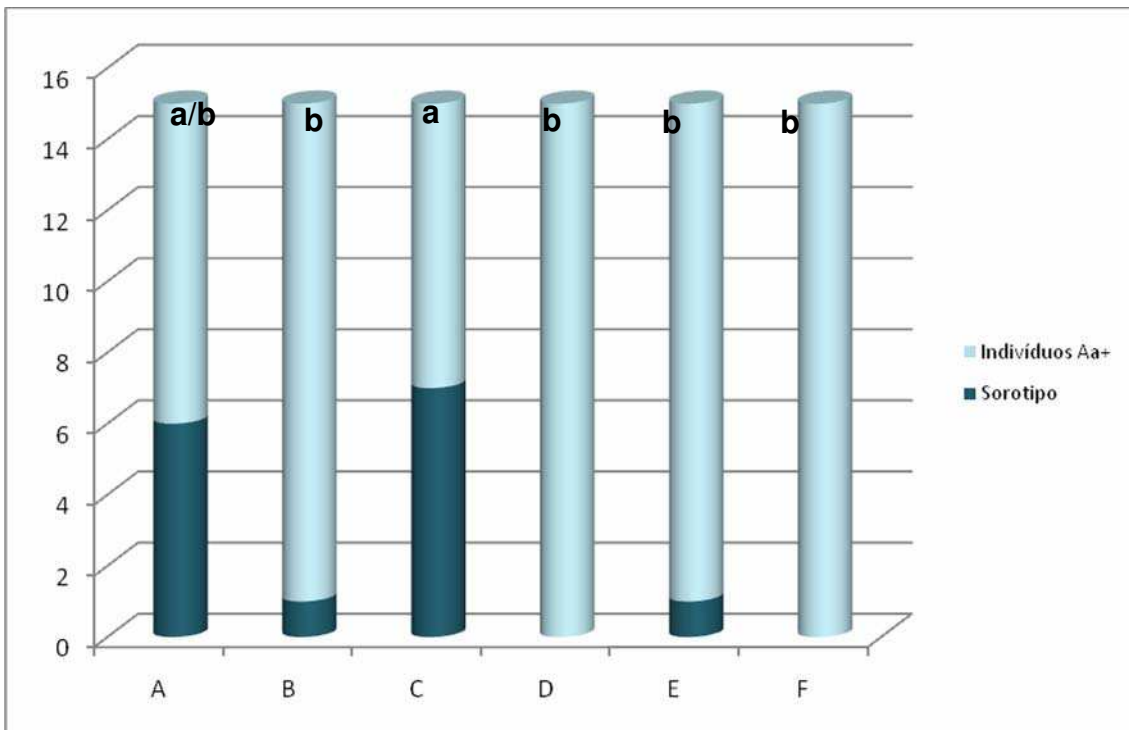


Figura 8-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* nos indivíduos diagnosticados com periodontite crônica 2
a, b - Teste Qui-quadrado ($p<0.05$)

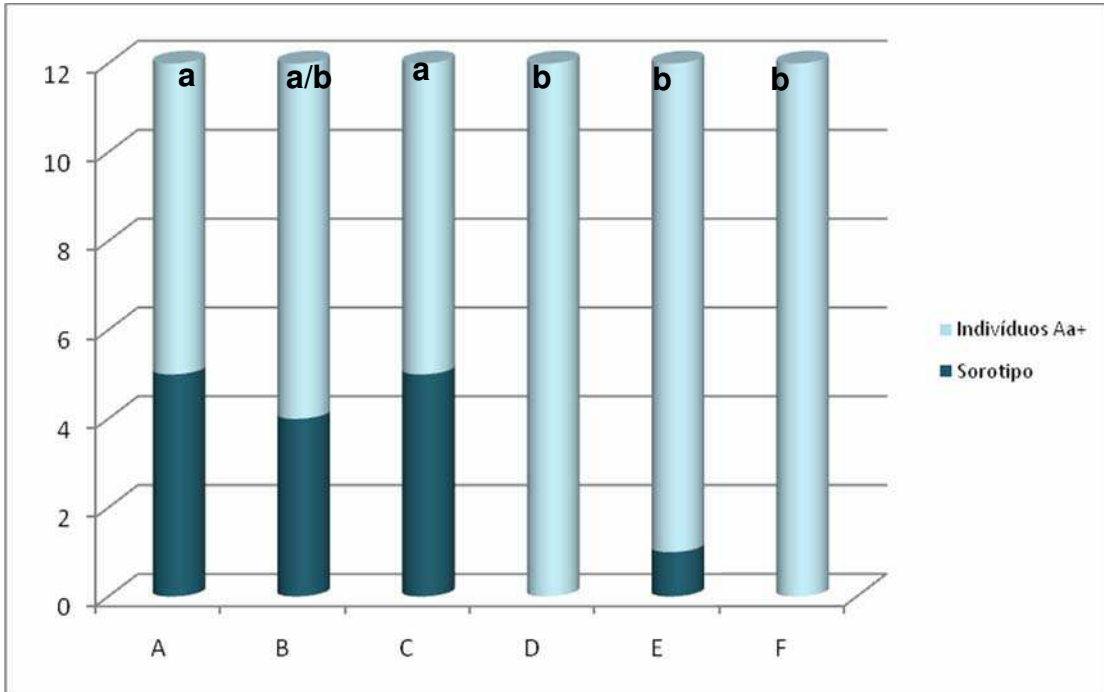


Figura 9-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* nos indivíduos diagnosticados com periodontite crônica 3
a, b - Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

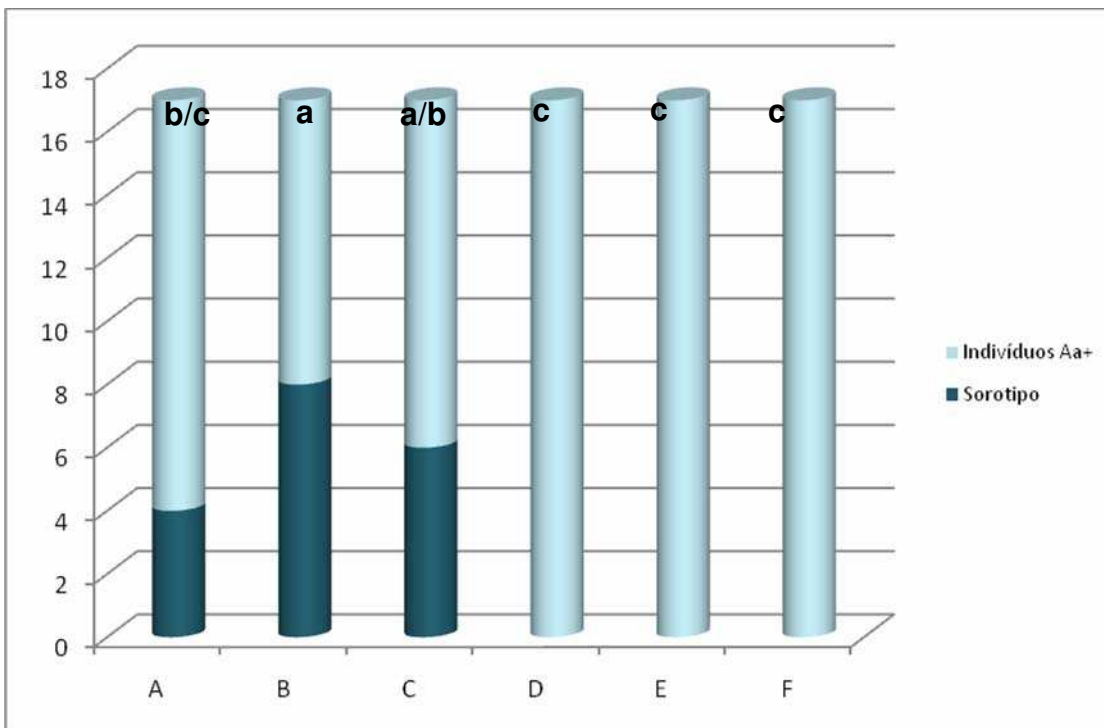


Figura 10-Distribuição da frequência de detecção dos sorotipos de *A.actinomycetemcomitans* nos indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva
a, b, c - Teste Qui-quadrado ($p < 0.05$)

6 DISCUSSÃO

A. actinomycetemcomitans foi primeiramente reconhecido como um possível patógeno periodontal devido à sua presença frequente e em números elevados em lesões de periodontite agressiva localizada (Newman & Socransky, 1977; Slots et al., 1980; Mandell & Socransky, 1981; Zambon et al., 1983; Chung et al., 1989) quando comparadas com amostras obtidas de indivíduos com outras condições clínicas, incluindo periodontite crônica, gengivite e saúde periodontal. Atualmente estudos têm demonstrado sua presença em indivíduos saudáveis (Tan et al., 2001; Joshi & Vandana, 2007), indivíduos com periodontite incipiente (Cortelli et al., 2008) e em indivíduos com periodontite crônica (Maida et al., 2003; Takeuchi et al., 2003; Ledder et al., 2007; Meng et al., 2007; Thiha et al., 2007; Lafaurie et al., 2007; Cortelli et al., 2008). Os principais objetivos do presente estudo foram avaliar a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na população composta por indivíduos com periodontite incipiente, periodontite crônica e periodontite agressiva, avaliar nesta população a distribuição de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade e dos sorotipos, além de relacionar dois fatores: idade e gênero, com a frequência dos sorotipos e leucotoxina. A realização deste estudo do tipo transversal, com uma proposta de caráter inédito na população brasileira, mostrou basicamente que os sorotipos **a**, **b** e **c** foram frequentemente encontrados e que amostras bacterianas de máxima leucotoxicidade foram raras nos indivíduos examinados.

Especificamente a prevalência geral de *A. actinomycetemcomitans* no presente estudo foi de 15,18%. Verifica-se que este dado esteve próximo aos observados em outras populações. Como exemplo, autores incluindo populações

européias, norte americanas, sul-americanas, oceânicas e asiáticas (Holttta et al., 1994; Mullally et al., 2000; Hamlet et al., 2001; Takeuchi et al., 2003; Lafaurie et al., 2007; Cortelli et al., 2008) encontraram prevalências entre 15 e 24%. Destaca-se porém que apesar de observarmos um dado prevalente similar na nossa população em relação a de outros países, os critérios de inclusão dos sujeitos da pesquisa nem sempre foram similares e poucos estudos alocaram indivíduos com periodontite incipiente, crônica e agressiva. Neste sentido, quando populações negras e asiáticas são estudadas existe uma tendência para aumento na prevalência deste patógeno. Por exemplo, nos estudos conduzidos em populações asiáticas encontramos prevalências de *A. actinomycetemcomitans* acima de 50% (Mombelli et al., 1999; Tan et al., 2001; Zhan et al., 2005). Alguns autores consideram que este microrganismo mais especificamente na população asiática pode ser considerado comensal principalmente pelo fato de que a alta prevalência não se associa ao desfecho de doença severa, ou até de uma alta prevalência da bactéria relacionada com saúde periodontal (Rylev & Kilian, 2008). Todavia, nestes estudos apenas a prevalência bacteriana tem sido descrita, sem caracterizar os sorotipos específicos ou a expressão de leucotoxina. Por estes motivos buscamos no nosso estudo associar a “especificidade” do microrganismo com o perfil periodontal.

Quando avaliamos em nosso estudo a condição periodontal dividida por grupos verificamos que nos indivíduos diagnosticados com periodontite incipiente a prevalência observada do microrganismo foi de 10%, sendo estatisticamente menor que nos demais grupos que exibiram as seguintes prevalências: os indivíduos diagnosticados com periodontite crônica 1 com prevalência de 16%, os indivíduos com periodontite crônica 2 com prevalência de 19%, os indivíduos com periodontite

crônica 3 com prevalência de 23%, e os indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva que apresentaram prevalência de 24% ($p < 0,05$).

Os dados observados no presente estudo para periodontite agressiva estiveram de acordo com outros realizados, Mullaly et al. (2000) encontraram prevalência de 19%, Hamlet et al. (2001), que relataram prevalência de 22,8%, Maida et al. (2003) e Takeuchi et al. (2003) observaram prevalência de 17,5%.

Em indivíduos com periodontite crônica os resultados foram de acordo com os observados anteriormente como Yoshida et al. (2003) que observaram prevalência de 19,5% em indivíduos japoneses; Ledder et al. (2007) observaram prevalência de 16% em indivíduos doentes e Thiha et al. (2007) encontraram também prevalência de 16% em indivíduos com periodontite crônica.

Em outros estudos, realizados na população brasileira, observamos dados prevalentes extremamente variados, por exemplo, Rosalem Junior et al. (2006), observaram a prevalência de 35% em indivíduos periodontalmente saudáveis e de 57,5% em indivíduos doentes; Avila-Campos & Velasques-Melendez (2002), detectaram este microrganismo em 70% de indivíduos saudáveis e em 90% dos indivíduos doentes. Mais recentemente, Cortelli et al. (2008) descreveram uma prevalência aproximada de 20% em indivíduos com periodontite incipiente e também em indivíduos doentes como o encontrado no presente estudo. Essa divergência na prevalência pode ser justificada pelo tipo populacional que se caracteriza por uma grande miscigenação de raças entre os brasileiros, principalmente por influencia histórica de africanos, indígenas e europeus. A identificação do fator raça não foi o foco dessa pesquisa, todavia, diversos autores associam ser, da raça negra ou asiática, como indicador de risco para aumento na frequência do patógeno (Tan et

al. 2001; Zhan et al. 2005; Feng et al. 2006; Joshi & Vandana 2007; Meng et al. 2007; Aimetti et al., 2007).

Características étnicas também irão influenciar na expressão leucotóxica produzida pelo *A. actinomycetemcomitans*, alguns estudos mostram a correlação de cepas de máxima leucotoxicidade com indivíduos árabes e da parte oeste do continente africano (Haubeck et al., 1995; Haubeck et al., 1997; Haubeck et al., 2007).

Estudos indicam que indivíduos com lesões periodontais mais severas, ou seja, com evidente presença de perda de inserção conjuntiva e óssea alveolar apresentam maior probabilidade de alocar *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade enquanto clones de mínima leucotoxicidade se associam a indivíduos apresentando reduzida perda de inserção conjuntiva e óssea alveolar (DiRienzo et al., 1994; Haubek et al., 1997; Macheleid et al., 1999; Haubek et al., 2001). No presente estudo não foi possível avaliar se indivíduos com maior perda de inserção clínica, ou seja, com história pregressa de doença mais severa, estavam associadas à presença de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade pois apenas três indivíduos apresentaram esta característica dificultando associações entre severidade e leucotoxicidade (ver detalhes abaixo).

Haubek et al. (1997) demonstraram que cepas de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de famílias de origem africana vivendo em diferentes áreas geográficas eram caracterizadas por uma supressão de 530 pares de base do gene da leucotoxina, levando a um aumento significativo na sua produção. Os autores especularam que esse tipo clonal extremamente virulento encontrado nos indivíduos de origem africana poderiam justificar a alta prevalência de periodontite agressiva nos afro-americanos e em outros indivíduos de descendência africana. O isolamento

deste tipo de clone, amostras JP2, ocorreu primeiramente em uma criança Afro-americana com oito anos de idade, diagnosticada com periodontite pré-pubertal (Kilian et al., 2006). Foi observada uma forte associação entre a presença de clones JP2 de *A. actinomycetemcomitans* e periodontite de início precoce em crianças escolares no Marrocos, porém não se observou tal associação quando da presença de *A. actinomycetemcomitans* sem a deleção de 530 pares de base (Haubek et al., 2001). Além disso, a razão de chance (*OR*) para a progressão da doença em um indivíduo desta população infectado com clone JP2 foi de 14,5 (Haubek et al., 2001). Estas observações foram corroboradas em uma população brasileira, onde amostras de máxima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* foram mais prevalentes em indivíduos com periodontite agressiva do que com periodontite crônica (Cortelli et al., 2005). Esta supressão não foi observada em amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de indivíduos adultos chineses (Mombelli et al., 1999; Tan et al., 2001) ou em indivíduos asiáticos nos Estados Unidos (Contreras et al., 2000).

Em nosso estudo três amostras mostraram cepas de máxima leucotoxicidade todas em indivíduos com periodontite crônica com médias de perda de inserção clínica variando entre 2,2mm até 5,1mm. Por outro lado, indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva ou incipiente não apresentaram cepas de máxima leucotoxicidade. Esperava-se encontrar uma associação positiva entre cepas de máxima leucotoxicidade com o diagnóstico de periodontite agressiva, porém isto não foi observado. Estudo conduzido por Haubek et al. (2007) demonstraram que esta associação também não esteve presente na população. Kaplan et al. (2002), observaram que cepas de máxima leucotoxicidade são mais prevalentes em populações de árabes e africanos e que o aumento da prevalência de periodontite

agressiva nessas populações deve ser devido a susceptibilidade do hospedeiro a cepas de máxima leucotoxicidade. Cepas de máxima leucotoxicidade parecem estar associadas somente a populações cuja linhagem possui descendência africana (Haubeck et al., 1997; Haraszthy et al., 2000). Muitos estudos mostram ausência dessas cepas em indivíduos etnicamente homogêneos, como europeus nórdicos (Haubeck et al., 1995; Macheleid et al., 1999; Contreras et al., 2000). Mas em indivíduos italianos, mais especificamente da Sardenha, frequentemente cepas de máxima leucotoxicidade são encontradas, provavelmente como reflexo da imigração do norte africano.

Assumimos no presente estudo não caracterizar nossa população pela raça, pois a única possibilidade seria adotar o critério estabelecido pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) que é tomada como oficial desde 1991 no qual a coleta de dados é baseada na autodeclaração, ou seja, a pessoa escolhe, de um rol de cinco itens (branco, preto, pardo, amarelo e indígena) em qual deles se aloca. Ainda de acordo com a convenção do IBGE, negro é quem se auto-declara preto ou pardo. Consideramos que a aplicação de auto denominação racial nos parece empobrecer a caracterização deste quesito. E, mesmo disponibilizando o DNA como material hereditário e o gene como unidade de análise, não é possível definir quem é geneticamente negro, branco ou amarelo. O genótipo sempre propõe diferentes possibilidades de fenótipos. O que herdamos são genes e não caracteres, e a predisposição biológica resulta e refere-se a um longo processo evolutivo da humanidade, é o binômio indissociável: constituição hereditária mais meio ambiente. O Brasil é um país mestiço, biológica e culturalmente (Oliveira, 2004).

Estudos têm demonstrado a relação dos sorotipos específicos de *A. actinomycetemcomitans* com a doença periodontal (Listgarten et al., 1981; Zambon et al., 1983; Chung et al., 1989; Asikainen et al., 1991; Saito et al., 1993; Haubeck et al., 1995; Mombelli et al., 1999; Paju et al., 2000; Tan et al., 2001; Laiko et al., 2002; Yoshida et al., 2003; Dogan et al., 2003; Teixeira et al., 2006; Thiha et al., 2007; van der Reijden et al., 2008) todavia, os achados parecem estar relacionados mais com aspectos étnicos e geográficos do que propriamente com o grau de severidade da doença.

O sorotipo de *A. actinomycetemcomitans* mais frequentemente isolado de lesões de periodontite agressiva localizada em indivíduos americanos foi o sorotipo **b** (Zambon et al., 1983), enquanto o sorotipo **a** foi detectado mais frequentemente em amostras de indivíduos adultos (Zambon et al., 1983). Esse achado é corroborado indiretamente pelo exame dos níveis séricos dos anticorpos para os dois sorotipos. As respostas mais elevadas para *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos portadores de periodontite agressiva localizada foi a do sorotipo **b**, enquanto respostas elevadas do sorotipo **a** foram mais comuns em indivíduos adultos diagnosticados com periodontite crônica (Listgarten et al., 1981). Em indivíduos finlandeses, os sorotipos **a** e **b** foram frequentemente isolados de indivíduos com doença periodontal, sendo o sorotipo **c**, associado a indivíduos periodontalmente saudáveis (Asikainen et al., 1991). No entanto, esse padrão de distribuição dos sorotipos não foi observado na Coreia (Chung et al., 1989) ou no Japão (Saito et al., 1993; Yoshida et al., 2003), onde o sorotipo **c** de *A. actinomycetemcomitans* pôde ser frequentemente observado em amostras de placa de sítios com doença periodontal.

No presente estudo, o sorotipo **b** (47,05%) mostrou-se significativamente mais prevalente em indivíduos com periodontite agressiva, seguido pelo sorotipo **c** (35,2%) que se apresentou estatisticamente mais prevalente que os demais sorotipos. Assim como outros estudos que mostram sorotipo **b** relacionado a doença periodontal (Zambon et al., 1983; Asikainen et al., 1991; Laiko et al., 2002); mas diferente de Teixeira et al. (2006) que observaram sorotipo **b** relacionado com saúde periodontal e com periodontite agressiva os sorotipos **a** e **c**.

Nos indivíduos com periodontite crônica o sorotipo **c** foi o mais prevalente, conforme descrito anteriormente em estudos realizados na população brasileira (Tinoco et al., 1997; Teixeira et al., 2006), e em estudos realizados em indivíduos japoneses, vietnamitas, coreanos e turcos (Mombelli et al., 1999; Tan et al., 2001; Yoshida et al., 2003; Dogan et al., 2003; Thiha et al., 2007). Indivíduos com periodontite crônica 1 exibiram prevalência do sorotipo **c** (61,9%) e ainda quatro cepas com múltiplos sorotipos no caso **a** e **c** e duas não sorotipáveis. Em indivíduos com periodontite crônica 2 a prevalência foi maior do sorotipo **c** (46,6%) e foi observado também uma cepa com duplo sorotipo **a** e **c** e um não sorotipável. Indivíduos com periodontite crônica 3 apresentaram prevalência dos sorotipos **c** (41,6%) e **a** (41,6%), e os múltiplos sorotipos nesse caso duas cepas sorotipos **a** e **b** e uma cepa sorotipo **a** e **c**.

Nos indivíduos com periodontite incipiente a maior prevalência encontrada foi do sorotipo **a** (60%) e sorotipo **c** (36,6%). Dependendo do tipo de classificação utilizada pacientes diagnosticados com periodontite incipiente podem ser considerados saudáveis, pois possuem discreta perda de inserção clínica. Divergências foram encontradas quando esses pacientes foram avaliados como saudáveis, Teixeira et al. (2006) observaram prevalência do sorotipo **b**; e Haubeck et

al. (1995), Laiko et al. (2002) e Yang et al. (2005) observaram prevalência do sorotipo **c**. Não existiu diferença significativa entre a prevalência dos sorotipos **a** e **c** encontrada em nosso estudo para indivíduos diagnosticados com periodontite incipiente.

Sorotipos **d**, **e** e **f** raramente são encontrados (Zambon et al., 1983; Haubeck et al., 1995; Paju et al., 2000) e não foram até então detectados na população brasileira (Teixeira et al., 2006). No Japão a prevalência observada de sorotipo **e** foi de 46,7% (Yoshida et al., 2003) e em chineses de 10,9% (Mombelli et al., 1999), na Finlândia de 6% (Saarela et al., 1992) e em estudo realizado na população da Indonésia a prevalência encontrada foi de 9,4% (van der Reijden et al., 2008). No presente estudo a prevalência encontrada de sorotipo **e** foi de 4,3%, em indivíduos diagnosticados com periodontite crônica. Sorotipos **d** e **f** não foram detectados nas amostras positivas para *A. actinomycetemcomitans* assim como reportado em outros estudos (Teixeira et al., 2006; van der Reijden et al., 2008).

A presença de múltiplos sorotipos é relatada em diversos estudos sendo estas cepas mais comumente encontrados em populações orientais do que em europeus, quando avaliados chineses e japoneses a prevalência encontrada foi de 16,8% (Mombelli et al., 1999) e de 25% (Yoshida et al., 2003) respectivamente. Em estudos realizados em finlandeses foi observada prevalência de 5,5% (Saarela et al., 1992) e de 7% (Asikainen et al., 1995). No presente estudo a prevalência de múltiplos sorotipos foi de 9,4% e somente observados em indivíduos com periodontite crônica, indivíduos com periodontite incipiente ou periodontite agressiva não exibiram cepas com múltiplos sorotipos.

Aproximadamente de 3% a 8% das cepas de *A. actinomycetemcomitans* não são sorotipáveis (Saarela et al., 1992; Asikainen et al., 1995; Suzuki et al., 2001). No

presente estudo cepas não sorotipáveis foram detectadas em 4,3% das amostras. Possivelmente algumas das cepas não sorotipáveis são derivadas de cepas sorotipáveis, mais especificamente do sorotipo *c* (Paju et al., 1998) e não observar determinado sorotipo não necessariamente indica ausência, pode ser devido ao baixo nível de detecção de determinado método de processamento das amostras (van der Reijden et al., 2008).

Em nosso estudo foi realizada separação dos sorotipos por gênero e idade (adotando corte de 33 anos, media de idade). Não foi encontrada diferença significativa entre homens e mulheres. Quando avaliados pela idade também não foi encontrada diferenças na prevalência dos sorotipos entre os grupos ($p < 0,05$).

7 CONCLUSÕES

A prevalência de *A. actinomycetemcomitans* observada no presente estudo mostrou-se similar a outros trabalhos realizados quando utilizada metodologia semelhante. Ao contrário de muitos estudos clones de máxima leucotoxicidade não foram relacionados com indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva. Os sorotipos **a**, **b** e **c** foram os mais prevalentes, sendo os sorotipos **a** e **c** relacionados com periodontite crônica e o sorotipo **b** relacionado com periodontite agressiva. O sorotipo **e** e duplos sorotipos (**a+b** e **a+c**) foram pela primeira vez relatados na população brasileira e relacionados com periodontite crônica. Idade e gênero não apresentaram diferenças na colonização por clones de máxima ou mínima leucotoxicidade nem na distribuição dos sorotipos.

REFERÊNCIAS

1. Socransky S, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol* 2000 1999; 20:341-62.
2. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):3859-69.
3. Kraig E, Dailey T, Kolodrubetz D. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect Immun* 1990; 58:920–29.
4. Lally ET, Golub EE, Kieba IR, Taichman NS, Decker S, Berthold P, et al. Structure and function of the B and D genes of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin complex. *Microb Pathog* 1991; 11:111–21.
5. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 1983; 54:707-11.
6. Asikainen S, Chen C, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1995;10(2):65-8.
7. Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33(2):395-401.
8. Haubek D, DiRienzo JM, Tinoco EMB, Westergaard J, Lopéz NJ, Chung CP. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3037–42.

9. Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N, Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early-onset periodontitis patients in relation to infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 2002; 29:657–60.
10. Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. J Clin Microbiol 2000; 38(1):79-84.
11. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol 2000; 71:912–22.
12. Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of o polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. Infect Immun 2001; 69:5375-84.
13. Kaplan JB, Schreiner HC, Furgang D, Fine DH. Population structure and genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains isolated from localized juvenile periodontitis patients. J Clin Microbiol 2002; 40:1181-87.
14. Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. Pesqui Odontol Bras 2003; 17(2):183-88.
15. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Harazythy V, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2005; 32(8):860-66.
16. Tinoco EM, Stevens RH, Haubek D, Lai CH, Balachandran S, Preus HR. Relationship of serotype, leucotoxin gene type and lysogeny in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to periodontal disease status. Eur J Oral Sci 1997; 105: 9-14.
17. Teixeira RE, Mendes EN, Carvalho MAR, Nicoli JR, Farias LM, Magalhães PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. Can J Microbiol 2006; 52:182-88.

18. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56:2135-46.
19. Zambon J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1985; 12(1):1-20.
20. Slots J. Salient biochemical characters of *A. actinomycetemcomitans*. *Archs Microbiol* 1982; 131(1):60-7.
21. Blix IJ, Hars R, Preus HR, Helgeland K. Entrance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* into HEp-2 cells in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 723-28.
22. Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1993; 61:1239-45.
23. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR, Kipps B, Tew JG. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect and Immun* 2000; 68:5416-19.
24. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in bucal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun* 2001; 69:2700-07.
25. Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I, Tsuchida N. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2000; 68: 4611-15.
26. Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihar T. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol* 2000; 49:739- 45.

27. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Scheiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycescomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol* 2000; 42:1114-57.
28. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Ann Rev Microbiol* 2000; 54:413-37.
29. Marques de Silva E, Caugant DA, Lingaas PS, Geiran O, Tronstad L, Olsen I. Detection of *Actinobacillus actinomycescomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2005; 76:590-94.
30. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive. *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(3):17-8.
31. Paturel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycescomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(2):98-118.
32. Kuroe A, Taniguchi A, Sekiguchi A, Ogura M, Murayama Y, Nishimura F, et al. Prevalence bacterial infection in non-obese Japan type 2 diabetic patients: relationship with C-reactive protein and albuminuria. *Horm Metab Res* 2004; 36(2):116-118.
33. Kim SJ, Park YH, Hong SP, Cho BO, Park JW, Kim SG. The presence of bacteria in the synovial fluid of the temporomandibular joint and significance: preliminary. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61(10):1156-1161.
34. Slots J. A. *Actinomycescomitans*. In: Nisengard RJ, Newman MG. *Microbiologia oral e imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.187-191.
35. Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhälä L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono or poly-infection by *Actinobacillus actinomycescomitans* serotypes a, b, c, d, or e. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:277-279.
36. Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycescomitans*. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:29-55.

37. López NJ, Mellado JC, Giglio MS, Leighton GX. Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. *J Periodontol* 1995; 66:559–567.
38. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(1):28-33.
39. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(4):266-73.
40. López NJ. Occurrence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in progressive adult periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71:948-954.
41. Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 2000; 35(4):232-41.
42. Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, et al. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. *J Clin Periodontol* 2001; 28(12):1163-71.
43. Tan KS, Woo CH, Ong G, Song KP. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. *J Clin Periodontol* 2001; 28(9):886-90.
44. Maida C, Campus G, Piana A, Solinas G, Milia E, Castiglia P. Periodontal status in an Italian young adult population. Prevalence and relationship with periodontopathic bacteria. *New Microbiol* 2003; 26(1):47-56.
45. Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuka M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *J Periodontol* 2003; 74(10):1460-69.
46. Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 2005; 76(2):289-94.

47. Zhan DF, Liu ZW, Xia XP, Hu JC, Chen LL, Yan J. Study on the detection of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* and the correlation between coinfections of the microbes and levels of chronic periodontitis lesion. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2005; 26(2):120-3.
48. Feng XH, Zhang L, Meng HX, Xu L, Chen ZB, Shi D. Prevalence of putative periodontal microorganisms in Chinese patients with aggressive periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2006; 41(6):344-47.
49. Ohnishi M. Quantitative analysis of periodontal pathogens in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 2006; 73(1):70-8.
50. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007; 78(9):1718-23.
51. Joshi VM, Vandana KL. The detection of eight putative periodontal pathogens in adult and rapidly progressive periodontitis patients: an institutional study. *Indian J Dent Res* 2007; 18(1):6-10.
52. Meng S, Wu YF, Yang H, Zhao L, Ou-Yang YL. Distribution of *Haemophilus actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis patients and periodontally healthy subjects. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007; 25(1):42-5.
53. Lafaurie GI, Contreras A, Baron A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. *J Periodontol* 2007; 78(4):629-39.
54. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, et al. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(2):516-23.
55. Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22:201-07.
56. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, Carvalho Filho J, Franco GC, et al. An etiological study analyzing initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J Clin Microbiol* 2008; 46(4):1322-29.

57. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 2008; 35(8):346-61.
58. Paju S, Saarela M, Alaluusua S, Fives-Taylor P, Asikainen S. Characterization of serologically nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36(7):2019-22.
59. van der Reijden WA, Bosch-Tijhof CJ, van der Velden U, van Winkelhoff AJ. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J Clin Periodontol* 2008; 35(6):487-92.
60. Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1989; 57(5):1465-69.
61. Lally ET, Kieba IR, Demuth DR, Rosenbloom J, Golub EE, Taichman NS, et al. Identification and expression of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 159(1):256-62.
62. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999; 20:136-67.
63. Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Koikeguchi S, et al. Biofilm formation by a fimbriae- deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol* 2003; 47(11):877-81.
64. Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, et al. Outer membrane protein100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* 2003; 50(4):1125-39.
65. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1(1):879-925.
66. Haubek D, Ennibi OK, Poulsen K, Poulsen S, Benzarti N, Kilian M. Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 2001; 80:1580-83.

67. Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque sample. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10):4829-32.
68. DiRienzo JM, Slots J, Sixou M, Sol MA, Harmon R, McKay TL. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1994; 62(8):3058-65.
69. Macheleidt A, Muller HP, Eger T, Putzker M, Zoller L. Clonal diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from young adults with minimal periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 34: 179-187.
70. Contreras A, Rusitanonta T, Chen C, Wagner WG, Michalowicz BS, Slots J. Frequency of 530-bp deletion in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter region. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(5):338-40.
71. Haubek D, Poulsen K, Kilian M. Microevolution and Patterns of Dissemination of the JP2 Clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 2007; 75(6):3080 - 88.
72. Chung H, Chung C, Son S, Nisengard R. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in a Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1989; 60(9):506-11.
73. Gmür R, McNabb H, van Steenberg T, Baehni P, Mombelli A, van Winkelhoff AJ, et al. Seroclassification of hitherto nonserotypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(12):116-20.
74. Saarela M, Dogan B, Alaluusua S, Asikainen S. Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains. *J Periodontol* 1999; 70:504-09.
75. Asikainen S, Lai CH, Alaluusua S, Slots J. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6(2):115-8.
76. Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(3):135-9.

77. Yamamoto M, Nishihara T, Koseki T, He T, Yamato K, Zhang YJ, et al. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in Japanese patients with periodontitis. *J Periodontal Res* 1997; 32(8):676-81.
78. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005; 113(1):28-33.
79. Mombelli A, Gmür R, Lang NP, Corbert E, Frey J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J Clin Periodontol* 1999; 26(8):505-10.
80. Suzuki N, Nakano Y, Yoshida Y, Ikeda D, Koga T. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(5):2002-5.
81. Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2):113-9.
82. Mombelli A, Gmür R, Frey J, Meyer J, Zee KY, Tam JO, et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in young Chinese adults. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13(4):231-7.
83. Gmür R, Baehni PC. Serum immunoglobulin G responses to various *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in a young ethnographically heterogeneous periodontitis patient group. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12(1):1-10.
84. Lakio L, Kuula H, Dogan B, Asikainen S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* proportions of subgingival bacterial flora in relation to its clonal type. *Eur J Oral Sci* 2002; 110:212-217.

85. Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun*. 1994 Feb; 62(2):501-8.
86. Tanner AC, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25:85–98.
87. Nibali L, Donos N, Brett PM, Parkar M, Ellinas T, Llorente M, et al. A familial analysis of aggressive periodontitis - clinical and genetic findings. *J Periodontal Res* 2008; 43(6):627-34.
88. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25(4):229-35.
89. Tanner AC, Kent RJr, Van Dyke T, Sonis ST, Murray LA. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol* 2005; 76(4): 573–81.
90. Tanner AC, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent Jr. R, Van Dyke T, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res* 2006; 85(4):318-323.
91. Roman-Torres CV, Cortelli SC, Araujo MW, Aquino DR, Cortelli JR. A short-term clinical and microbial evaluation of periodontal therapy associated with amalgam overhang removal. *J Periodontol* 2006; 77(9):1591-97.
92. Newman MG, Socransky SS. Predominant cultivable microbiota in periodontosis. *J Periodontal Res* 1977; 12(2):120-8.
93. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 1980; 29(3):1013-20.
94. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1981; 52(10):593-8.
95. Meng S, Wu YF, Yang H, Zhao L, Ou-Yang YL. Distribution of *Haemophilus actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis patients and periodontally healthy subjects. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007; 25(1):42-5.

96. Zhan DF, Liu ZW, Xia XP, Hu JC, Chen LL, Yan J. Study on the detection of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* and the correlation between coinfections of the microbes and levels of chronic periodontitis lesion. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2005; 26(2):120-3.
97. Rosalem Junior W, Andrade AFB, Colombo APV. Prevalence of leukotoxic genotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2006; 37(4):590-6.
98. Avila-Campos MJ, Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44(1):1-5.
99. Meng S, Zhao L, Yang H, Wu Y, Ouyang Y. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. *Quintessence Int* 2007; 40(1):53-60.
100. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2007; 78(9):1718-23.
101. Kilian M, Frandsen EV, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol 2000* 2006; 42:158-79.
102. Oliveira F. Ser negro no Brasil: alcances e limites. *Estud Av* 2004; 18(50):57-60.
103. Listgarten MA, Lai CH, Evian CI. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol* 1981; 8(3):155-64.
104. Saito A, Hosaka Y, Nakagawa T, Seida K, Yamada S, Takazoe I, et al. Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(3):146-153.
105. Doğan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, et al. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(6): 803-814.

ANEXOS

ANEXO A - Carta de Informação

CARTA DE INFORMAÇÃO

Caro indivíduo,

A doença periodontal é aquela doença que acontece na gengiva deixando os dentes moles sem formar cavidade. A doença de gengiva também causa mal hálito (cheiro ruim na boca) e sangramento ao escovar os dentes, comer ou dormir. A placa dental (massa branca e mole) e o tártaro (massa dura) que provocam a doença de gengiva são formados por muitas bactérias. Esse estudo quer verificar a presença de uma bactéria que poderá estar em sua boca e por isto causar doenças de gengiva. Para isso, será preciso coletar um pouco de material da boca. O material é coletado com uma ponta de papel e o exame não causa dor ou incômodo. Todas as pessoas que participarem do estudo receberão tratamento para os problemas de gengiva. Se a pessoa precisar de outros tratamentos como canal ou obturação, ela será encaminhada para as outras disciplinas do Departamento de Odontologia da UNITAU. Em caso de tratamento que exige serviço de terceiros, como confecção de próteses, cada professor responsável, junto com a Assistente Social, irão estabelecer os preços e o número de vezes para efetuar o pagamento.

Se você não quiser mais participar do estudo, quando desistir continuará recebendo o tratamento. Você só irá precisar avisar o dentista.

Os resultados dos seus exames serão avaliados junto com os resultados dos outros participantes, e as pessoas de fora não verão quem é você nem os resultados dos seus exames. Mas, você vai saber dos seus resultados.

Não existe risco de você se machucar participando do estudo.

Como pesquisadores responsáveis pelo estudo, estaremos sempre à disposição para você tirar qualquer dúvida. Procure a Clínica de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da UNITAU - Rua Expedicionário Ernesto Pereira, nº 110 – Centro - Taubaté - SP - (012) 225-4147.

Atenciosamente,

Pesquisadores responsáveis

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG
_____, residente à _____
_____, acredito ter
sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para
mim, descrevendo o estudo PREVALENCIA E EXPRESSÃO GENICA DE
AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS ASSOCIADO A DOENÇA
PERIODONTAL. Discuti com os pesquisadores Dr. José Roberto Cortelli, Profa. Dra. Sheila
Cavalca Cortelli, Profa. Dra. Marinella Houlzhausen e Caio Vinicius Gonçalves Roman-
Torres sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais
são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e
riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro
também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a
tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e
poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem
penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

_____(__/__/__)

Assinatura do paciente/representante

_____(__/__/__)

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e
Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ (__/__/__)

Assinatura dos pesquisadores responsáveis

ANEXO C - Ficha de anamnese e avaliação periodontal

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Nome do paciente _____ Número: _____

Nascimento ___/___/___ Idade _____ Gênero _____

Endereço _____

Cidade _____ Cep _____ Fone: () _____

Profissão _____ Estado Civil _____

R.G.: _____ C.I.C.: _____

Data da coleta ___/___/___

Há quanto tempo foi a sua última consulta médica? _____

Qual o motivo? _____ Médico: _____

No momento está fazendo algum tratamento médico? _____

Está tomando algum medicamento? Sim () Não ()

NOME	DOSAGEM	TEMPO DE USO

Tem sensibilidade a algum anestésico ou alergia a algum medicamento: _____

Pressão arterial: _____ Fuma? _____ Quantidade. cigarros/dia: _____ Ex.-

fumante? _____ Tempo que fumou: _____ Há quanto tempo parou?

_____ Anexos _____ Está grávida? _____ Quantos meses? _____ Toma

anticoncepcional? _____ Está na menopausa? _____ A quanto tempo? _____

Faz reposição hormonal? _____ Possui alguma outra alteração

hormonal? _____ Qual? _____ Faz tratamento? _____

Possui ciclo menstrual regulado? _____ Usa fio dental? Sim () Não ()

Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____ Você já passou por um

tratamento periodontal? _____ Há quanto tempo? _____

ANEXO D- Determinação de periodontite crônica 1, 2 e 3 baseada em estudos prévios

Foram incluídos no estudo 1376 indivíduos, 475 homens e 901 mulheres. Desse total, 256 saudáveis, 96 com periodontite incipiente 1, 207 com periodontite incipiente 2, 254 com periodontite incipiente 3, 257, com periodontite crônica 1, 224 com periodontite crônica 2, e 82 com periodontite crônica 3. (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição da população estudada

	Masculino N=475	Feminino N=901	Total N=1376
Saudável	95 (20%)	161(17.87%)	256 (18.60%) (19.23±4.42)
Incipiente 1	42(8.84%)	54(5.99%)	96 (6.98%) (20.63±5.12)
Incipiente 2	63(13.26%)	144(15.98%)	207 (15.04%) (21.02±3.93)
Incipiente 3	82(17.26%)	172(19.09%)	254 (18.46%) (22.85±5.24)
Crônica 1	107(22.53%)	150(16.65%)	257 (18.68%) (26.01±7.16)
Crônica 2	55(11.58%)	169(18.76%)	224 (16.28%) (29.11±8.2)
Crônica 3	31(6.53%)	51(5.66%)	82 (5.96) (30.67±8.24)

Quando os indivíduos foram classificados pela classificação adotada por Cortelli et al. (2008) com corte em $\text{NCI} \geq 2$, 947 foram incluídos e apresentou 154 indivíduos foram classificados como não casos, 292 com periodontite estabelecida 1, 111 com periodontite estabelecida 2, 2 com periodontite estabelecida 3 e 388 não foram classificados; com corte em $\text{NCI} \geq 3$, 793 foram incluídos e apresentou 101 indivíduos foram classificados como não casos, 292 com periodontite estabelecida 1, 111 com periodontite estabelecida 2, 2 com periodontite estabelecida 3 e 287 não foram classificados; com corte em $\text{NCI} \geq 4$, 479 foram incluídos e apresentou 57 indivíduos foram classificados como não casos, 227 com periodontite estabelecida 1, 110 com periodontite estabelecida 2, 2 com periodontite estabelecida 3 e 83 não foram classificados (Tabela 2).

Tabela 2 – Cortelli et al (2008)

	Classificação	Com $\text{NCI} \geq 2$ mm (n=947)	Com $\text{NCI} \geq 3$ mm (n=793)	Com $\text{NCI} \geq 4$ mm (n=479)
Cortelli et al, 2008	Não-casos	154	101	57
	Estabelecida 1	292	292	227
	Estabelecida 2	111	111	110
	Estabelecida 3	2	2	2
	Não classificados	388	287	83

A Figura 1 mostra a distribuição de NCI de 2mm em função do número de dentes, mostrou valor significativo a presença de um e dois dentes com NCI de 2mm. A Figura 2 mostra a distribuição de NCI de 3mm em função do número de dentes, mostrou maior valor significativo a presença de dois dentes com NCI de 3mm. A

Figura 3 mostra a distribuição de NCI de 4mm em função do número de dentes, mostrou maior valor significativo a presença de dois dentes com NCI de 2mm.

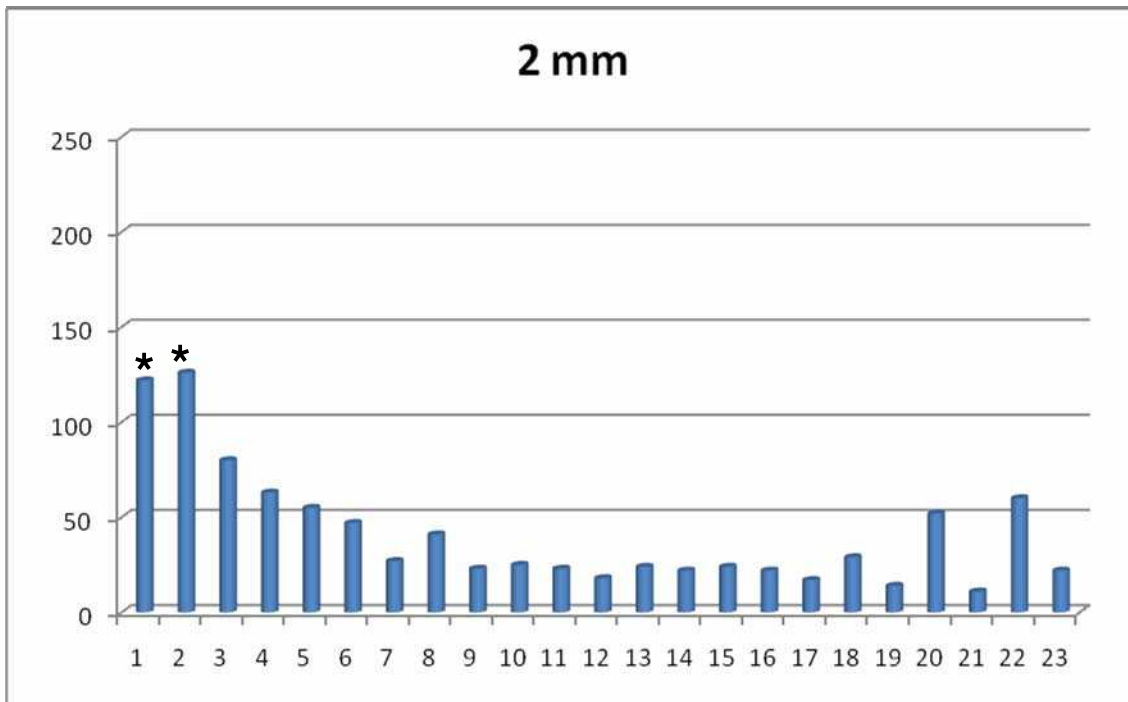


Figura 1 – Distribuição da presença de NCI de 2mm em função do número de dentes acometidos simultaneamente.

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Maior valor comparativo

‡ - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Segundo maior valor comparativo

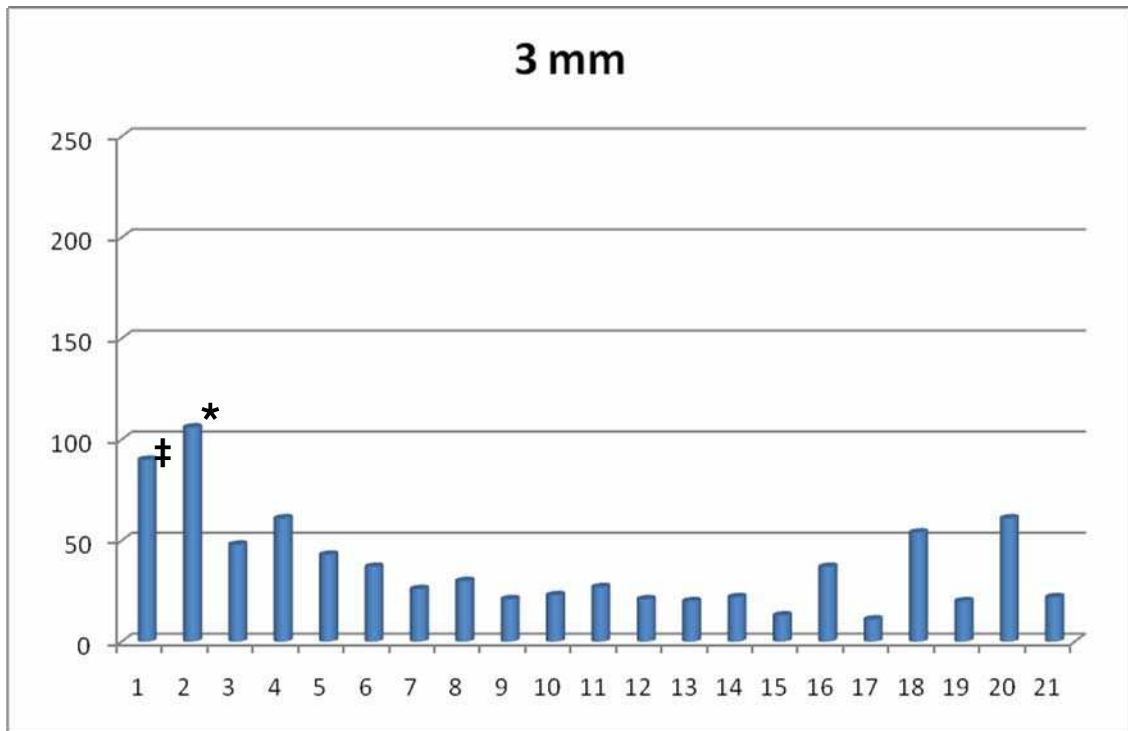


Figura 2 – Distribuição da presença de NCI de 3mm em função do número de dentes acometidos simultaneamente.

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Maior valor comparativo

‡ - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Segundo maior valor comparativo

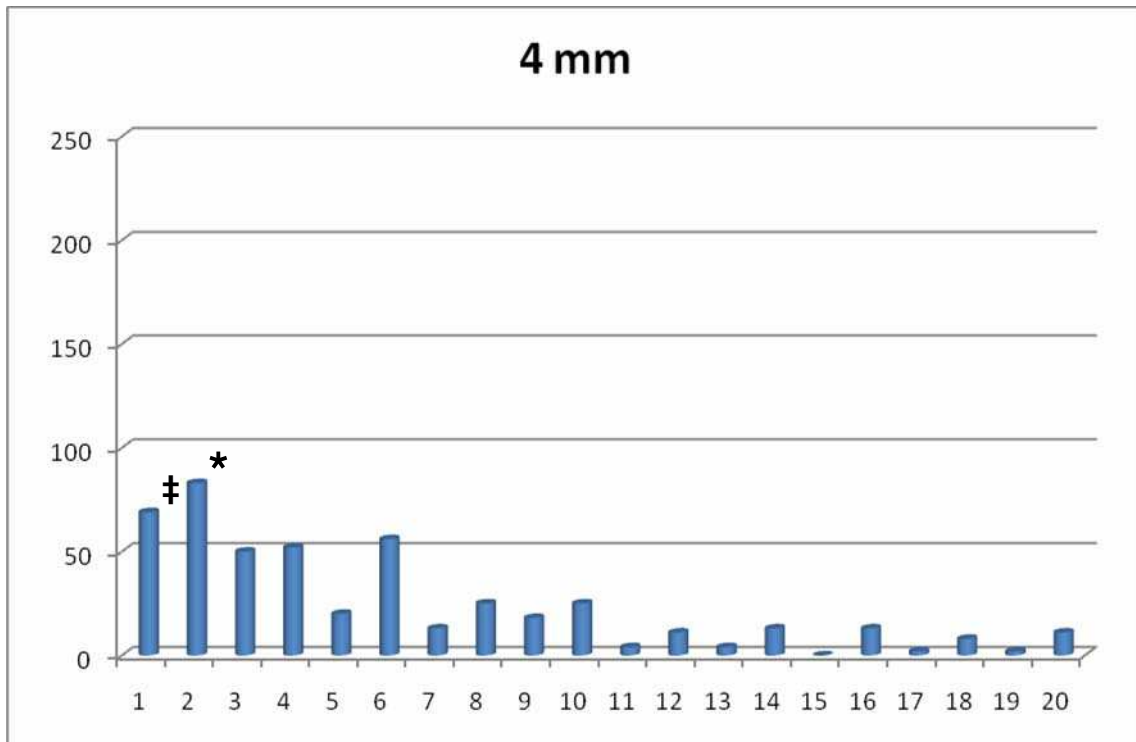


Figura 4 – Distribuição da presença de NCI de 4mm em função do número de dentes acometidos simultaneamente.

* - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Maior valor comparativo

‡ - Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) – Segundo maior valor comparativo

ANEXO E- Artigo submetido a publicação

Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects.

Caio Vinicius Gonçalves Roman-Torres*, ca.torres@uol.com.br, Davi Romeiro Aquino* daviaquino@uol.com.br, Sheila Cavalca Cortelli* cavalcacortelli@uol.com.br, Gilson César Nobre Franco* gilsonfop@yahoo.com.br, Juliana Guimarães dos Santos* juliana_biol@yahoo.com.br, Priscila Corraini° pcorraini@usp.br, Marinella Holzhausen* mholzhausen@hotmail.com, José Roberto Cortelli* jrcortelli@uol.com.br

*Department of Periodontology and Preventive Dentistry, Dental Research Division, University of Taubaté, SP. Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110 - Centro, Taubaté 12020-330, SP, Brasil

°Division of Periodontics, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo. Av. Professor Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitaria, São Paulo 05508-900, SP, Brazil

Abstract

Previous studies have suggested that *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is involved in the aetiology of aggressive periodontitis as well as chronic periodontitis. In addition, some authors have also reported that serotype-specific antigens of *A. actinomycetemcomitans* determine the severity of disease. This study aimed to elucidate the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and the distribution of *A. actinomycetemcomitans* serotypes in Brazilian subjects with chronic periodontitis. A

total of 486 individuals were enrolled in this survey. All patients received clinical examinations that included periodontal pocket depth, clinical attachment loss, plaque, and gingival indexes. Subgingival samples were taken for microbial analysis. The genomic DNA of *A. actinomycetemcomitans* was provided by PCR. Out of 486 subjects examined, *A. actinomycetemcomitans* was isolated in 85 (17.5%) individuals. Out of 85 positive samples, 75 were infected by at least 1 serotype, 7 by mixed infection. Serotype c showed the highest prevalence (52.9%), followed by serotype a (31.8%). Intragroup analysis revealed that, in slight/moderate periodontitis, serotypes c and a were significantly more prevalent than serotypes b, d, e and f; the prevalence of serotype c in severe periodontitis was significantly greater than that of serotypes a and b. Our data were similar in Asian and Eurasian populations.

Key words: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Periodontitis; Serotype; Prevalence.

Introduction

Chronic periodontitis is a slowly progressing form of destructive periodontal disease. The prevalence of this oral pathology varies with race and geographic region. The prevalence of mild to moderate forms of chronic periodontitis could reach 60% of the worldwide population. On the other hand, advanced forms (which affect fewer subjects) are observed in 10 to 15% of the global population (Papapanou 1996, Bown et al. 1996, Rylev and Kilian 2008).

Clinical and microbiological studies have identified only a few bacterial species associated with periodontal disease in adults (Haffajee and Socransky 1996). The

American Academy of Periodontology (1996), in its consensus report published in 1996, designated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as one of the periodontal pathogens functioning as an etiological agent of periodontitis. The presence of *A. actinomycetemcomitans* has been shown to be a useful indicator of active sites of periodontal disease and clinical attachment loss.

A. actinomycetemcomitans is a gram-negative, facultative anaerobic coccobacillus bacterium that colonizes the oral cavities of humans (Zambon 1996). *A. actinomycetemcomitans* has been associated with localized and generalized aggressive periodontitis and also with chronic periodontitis (Nonnenmacher et al. 2001, Cortelli et al. 2005, Leung et al. 2005).

The bacterium expresses several putative virulence factors, including a leucotoxin (Lally et al. 1989). Leucotoxin is a potent virulence factor produced by *A. actinomycetemcomitans*, which is encoded in an operon consisting of four genes (Brogan et al. 1994), and typically causes cytotoxicity in neutrophils (Iwase et al. 1992) and macrophages (Rabie et al. 1988). Production of leucotoxin by *A. actinomycetemcomitans* is believed to be one mechanism used by the bacterium to evade host immune responses (Baehni et al. 1981). Greater mean attachment loss was found in subjects with highly leucotoxic *A. actinomycetemcomitans* as compared to subjects with minimally leucotoxic varieties or subjects whom were not infected (Cortelli et al. 2005).

Additionally, different serotypes of *A. actinomycetemcomitans* have been shown to be associated with periodontal health and disease. Slots et al. (1982) determined the serotype antigens of *A. actinomycetemcomitans* to be heat-stable, high-molecular-weight, primarily carbohydrate moieties located on bacterial cell surfaces. Three distinct serotypes of *A. actinomycetemcomitans* have been

described. Zambon et al. (1983) showed an increased proportion of serotype b among patients with aggressive periodontitis (formerly juvenile periodontitis), whereas serotypes a and c have a stronger association with periodontal health.

Nowadays, *A. actinomycetemcomitans* strains are classified into six serotypes (a, b, c, d, e, and f) corresponding to six structurally and antigenically distinct O-PS components of their LPS molecules (Kaplan et al. 2001).

Different serotypes have been shown to be associated with periodontal health, aggressive or chronic periodontitis, and with different racial, ethnic, and geographic populations, suggesting that serotype-specific strain differences may be responsible for host specificity and virulence (Asikainen et al. 1995, Haubek et al. 1997, Kaplan et al. 2001).

Therefore, the present study aimed to establish (a) the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* and (b) the distribution of *A. actinomycetemcomitans* serotype-specific antigens in Brazilian subjects diagnosed with chronic periodontitis.

Materials and methods

Subjects

Participants included in the present study were recruited at the Department of Dentistry, University of Taubate, Sao Paulo, Brazil, from July 2007 to December 2008. Potential subjects were screened for exclusion criteria, such as: (i) antibiotic prophylaxis for dental treatment, (ii) uncontrolled systemic diseases, (iii) immunological compromise, (iv) pregnancy or women currently breast-feeding, (v) periodontal treatment 12 months before the beginning of the study, (vi) antibiotic treatment within 6 months prior to the clinical and microbial examination. Ultimately,

486 subjects were recruited for the study. Data and personal information related to medical and dental histories of the subjects were obtained from responses by individuals or their parents to our questionnaire. Either subjects themselves, or their legal guardians, signed an informed consent form, which was previously approved by the Institutional Committee on Research Involving Human Subjects of the University of Taubate.

Clinical procedures

One trained and calibrated examiner conducted all clinical measurements and collected the microbial samples. The examiner's clinical measurement technique was considered calibrated if the standard error for the measurements was ≤ 0.8 and the K value ranged between 0.8 and 0.95. The reproducibility of the intraexaminer measurements was recalculated after 6 months.

A complete periodontal examination was conducted to register probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), gingival index (GI) (Loe and Silness 1963) and plaque index (PI) (Silness and Loe 1964) in six periodontal sites per tooth by one trained and calibrated examiner, using a manual periodontal probe (PCPUNC 15 Hu-Friedy Mfg. Co., Inc., Chicago, IL). A diagnosis of chronic periodontitis followed the criteria defined by American Academy Periodontology (1999). Severity was based on the amount of clinical attachment loss (CAL), designated as slight (1-2 mm CAL), moderate (3-4 mm CAL) or severe (> 5 mm CAL). In addition, subjects underwent radiographic examination to evaluate the extent of periodontal bone resorption.

Microbial sampling and laboratory procedures

A pooled subgingival sample was collected from each subject (486 subjects), from the mesiobuccal aspect of all first molars ($n= 4$ molars/subject) and mesial incisors ($n= 2$ incisors/subject, right maxillary or left mandibular), using sterile paper points inserted to the depth of the gingival sulcus after removal of supragingival plaque using sterile cures. For subjects missing those teeth (first molars and mesial incisors), microbial samples were obtained from second molars and/or lateral incisors.

After being placed in the gingival sulcus for 60 seconds, paper points were removed and immediately transferred into a microtube containing reduced Ringer's solution (1 ml) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, United Kingdom). The bacterial cells in the microtube were dispersed using a vortex mixer at maximal setting for 1 min and then maintained at -80°C until laboratory processing. The presence of *A. actinomycetemcomitans* was determined by polymerase chain reaction (PCR), as described below.

The subgingival samples in the microtube were dispersed using a Vortex and centrifuged (3 minutes at 12,000 rpm). From the cellular bacteria pellet, genomic DNA was extracted using a commercial DNA purification Kit (InstaGene[®], Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Initially, PCR technique was used to identify samples positive for *A. actinomycetemcomitans* using a pair of primers for the 16s ribosomal DNA (rDNA) gene (Table 1). PCR was performed in a Mastercycler Gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) thermocycler using the following protocol: initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min., and a final extension of 72°C for 5 min.

For the *A. actinomycetemcomitans*-positive samples, serotyping was carried out using primers specific for each serotype (a-f). DNA sequences of the primers used in the present study are described in Table 1. The PCR conditions were the same as described by Teixeira et al. (2006). The products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with SYBR Safe[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and photographed under ultraviolet light. A 100-bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as the molecular weight marker. Positive controls (serotype a: ATCC 29523; serotype b: Y4; serotype c: NCTC 9710; serotype d: IDH 781; serotype e: IDH 1705 and serotype f: CU 1000) and negative controls were included for the PCR reaction.

Statistical analysis

The frequency of *A. actinomycetemcomitans* serotype-specific antigens (a, b, c, d, e, and f) among slight/moderate and severe chronic periodontitis was analysed using the chi-squared test. The significance of differences was established at 5% ($P < 0.05$). All tests were performed using statistical software (Biostat 5.0 and SPSS 15.0 for Windows Release 15.0)

Results

A total of 486 subjects (mean age 33.41 ± 9.76 years) diagnosed with chronic periodontitis were enrolled in this study. Out of 486 subjects, 294 (mean age 32.11 ± 11.10 years) were considered to have slight to moderate chronic periodontitis, while 192 (mean age 34.69 ± 9.91) were considered to have severe chronic periodontitis.

Out of 486 subjects with chronic periodontitis, *A. actinomycetemcomitans* was isolated from 85 (17.5%) individuals. The distribution of *A. actinomycetemcomitans*-positive individuals according to gender, age and severity of chronic periodontitis is presented in Table 2. The prevalence of *A. actinomycetemcomitans* according to the diagnostic examination showed that out of 294 subjects with slight to moderate chronic periodontitis, 51 (17.3%) were *A. actinomycetemcomitans*-positive, while this bacteria was isolated in 34 (17.7%) out of 192 patients with severe chronic periodontitis.

The serotype-specific antigens used in *A. actinomycetemcomitans* analysis showed that out of 85 cases of chronic periodontitis, 75 individuals were positive for at least one serotype-specific of *A. actinomycetemcomitans* (Table 3), while 10 individuals were not positive for any serotype tested. Interestingly, out of 75 individuals, 7 (9.33%) showed mixed infection by serotypes a and b (2 individuals) or a and c (5 individuals). Serotype e exhibited low prevalence and serotypes d and f were not detected (Table 3).

With regard to frequencies of *A. actinomycetemcomitans* serotypes, independent of disease severity, serotype c showed the highest prevalence (52.9%), followed by serotype a (31.8%). Figure 1 illustrates the distribution of other serotypes examined in this study.

Intragroup analysis according to periodontal diagnosis revealed that in slight to moderate chronic periodontitis, serotypes c and a were significantly more prevalent than serotypes b, d, e and f (Figure 2). The prevalence of serotype c in subjects with severe chronic periodontitis was significantly greater than the prevalence of serotypes a and b. Figure 3 shows the prevalence of all serotypes in subjects with severe chronic periodontitis. There was no significant difference between patients

with slight/moderate and severe chronic periodontitis, with regard to the frequency of serotypes (Table 4) (intergroup analysis).

Discussion

A. actinomycetemcomitans is a microorganism mainly related to aggressive periodontitis (Nonnenmacher et al. 2001, Leung et al. 2005, Joshi and Vandana 2007, Rylev and Kilian 2008); however, it has also been associated with chronic periodontitis (Meng et al. 2007, Wu et al. 2007, Rylev and Kilian 2008). Few studies have been designed to examine the prevalence of this pathogen in chronic periodontitis subjects in Brazilian populations (Cortelli et al. 2005, Cortelli et al. 2005b, Jardim Junior et al. 2006, Rosalem Junior et al. 2006). The frequency distribution of *A. actinomycetemcomitans* (a-f) varies among populations from geographically distinct areas and the specific serotypes may be associated with periodontal conditions. One of the major goals of this cross-sectional study was to determine the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* in Brazilian subjects diagnosed with chronic periodontitis. The second aim of this study was to elucidate the frequency distribution of *A. actinomycetemcomitans* serotypes, according to the severity of disease in the studied population.

In our study, the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* was 17.5%, varying from 17.3% for slight/moderate chronic periodontitis to 17.7% in severe chronic periodontitis. No significant difference in prevalence was observed among the various degrees of periodontal disease severity. The prevalence data (17.5%) observed in the present study is in agreement with data previously reported by our group (Cortelli et al. 2005), as well as the study conducted by Yoshida et al. (2003)

which found *A. actinomycetemcomitans* in 19.5% of 328 Japanese subjects with chronic periodontitis. Other prevalence studies focused on the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* among chronic periodontitis subjects in European, Asian and American populations, finding no significant difference (Slots et al. 1990, Dahlén et al. 1995, Ashimoto et al. 1996, Dogan et al. 2003).

Six serotypes of *A. actinomycetemcomitans* have been recognised so far. However, in general, our study confirms that serotypes a, b and c occur much more frequently among oral isolates than serotypes d, e and f. In addition, studies showed that infection with multiple serotypes is possible. For example, van der Reijden et al. (2008) observed a relatively high prevalence of subjects with multiple serotypes and Yang et al. (2005) found multiple clones in subjects with aggressive and chronic periodontitis. In our study, we found that out of 75 *A. actinomycetemcomitans*-positive serotypes, 7 (9.33%) subjects were positive for multiple serotypes. Therefore while infection with multiple serotypes was observed, most subjects in our study harboured a single serotype.

Several studies suggest that different *A. actinomycetemcomitans* serotypes are associated with periodontal health, periodontitis, and non-oral infections. In the United States, serotype b is detected more frequently than serotypes a and c in patients with localised juvenile periodontitis (Zambon et al. 1983). In Finland, serotype b is predominant in periodontitis patients and serotype c is frequently isolated in periodontally healthy individuals (Asikainen et al. 1991). In Japanese patients with periodontitis, serotypes a, c, and e are predominant (Yamamoto et al. 1997). Gunsolley et al. (1991) observed that advanced periodontitis was associated with higher levels of serotype b and c in black subjects, whereas in white individuals serotype a was associated with advanced periodontitis.

The main result of our study shows that *A. actinomycetemcomitans* serotype c was the serotype most frequently (52.9%) associated with chronic periodontitis, followed by serotype a (31.8%) and serotype b (9.41%). On the other hand, no patients were positive for serotypes d or f. When we consider the intra-group analysis, serotypes c and a were significantly more prevalent than serotypes b, d, e and f in slight-to-moderate chronic periodontitis. In addition, the prevalence of serotype c in subjects with severe chronic periodontitis was also significantly greater than the prevalence of serotypes a and b. When these data are compared at the level of global study populations, they are in agreement with several Asian and Euroasian studies. For example, several authors showed a clear predominance of serotype c in Japanese, Chinese, Vietnamese, Korean, and Turkish periodontitis subjects (Chung et al. 1989, Saito et al. 1993, Holttä et al. 1994, Dahlén et al. 1995, Mombelli et al. 1999, Tan et al. 2001, Rosalem Junior et al. 2006, Thiha et al. 2007). On the other hand, studies performed in northern Europe showed that serotypes a, b, and c usually exhibit near-equivalent frequency (Saarela et al. 1992, Lakio et al. 2002).

To date, only two studies were conducted in Brazilian populations to investigate the presence and distribution of *A. actinomycetemcomitans* serotypes. First, Tinoco et al. (1997) described that serotype c was more frequently found in both aggressive periodontitis and chronic periodontitis than serotype b. Furthermore, of the isolated serotype c strains, the great majority (88%) originated from periodontally-affected subjects. Then, in 2006 Teixeira et al. (2006) conducted a study describing the occurrence of *A. actinomycetemcomitans* serotypes in patients with aggressive and chronic periodontitis as well as healthy subjects. Specifically,

80% of chronic periodontitis patients were positive for *A. actinomycetemcomitans* serotype c, while serotype a was found in 20% and serotype b was not present.

Studies performed by Tinoco et al. (1997) as well as Teixeira et al. (2006), as well as our findings, show a higher prevalence of serotype c in patients diagnosed with severe periodontitis. Neither our study nor that performed by Teixeira et al. (2006) found serotype d or f among the Brazilian population. Our population comprised 486 subjects diagnosed with chronic periodontitis. While many individuals in Brazil are regarded as of mixed race, the population included in this study comprised primarily whites and mestizos, with no individuals of Asian or European ancestry included. Our data, however, are similar to those from studies performed in Asia as well as in Eurasia. As stated by Rylev and Kilian (2008), more information is required to conclude as to the potential importance of ethnicity for these differences.

In conclusion, these results demonstrated that the prevalence of *A. actinomycetemcomitans* (17.5%) in Brazilian chronic periodontitis subjects is in agreement with several studies conducted in different countries that applied similar methodologies. With regard to the frequency of *A. actinomycetemcomitans* serotypes, independent of disease severity, serotype c exhibited the highest prevalence in the studied population. Similar data can be observed in other Brazilian studies and also in Asian and Eurasian populations.

Acknowledgement

This study was supported by a grant from the FAPESP (São Paulo Foundation for Research).

References

- American Academy of Periodontology. 1996. Consensus report: section on epidemiology. *Ann. Periodontol.* **1**: 216-218
- Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**(4): 266-273.
- Asikainen, S., Chen, C., Slots, J. 1995. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**: 65–68.
- Asikainen, S., Lai, C.H., Alaluusua, S., Slots, J. 1991. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**(2): 115-118
- Baehni, P.C., Tsai, C.C., McArthur, W.P., Hammond, B.F., Shenker, B.J., Taichman, N.S. 1981. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. *Arch. Oral Biol.* **26** :671-676.
- Brogan, J.M., Lally, E.T., Poulsen, K., Kilian, M., Demuth, D.R. 1994. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect. Immun.* **62**: 501-508.
- Brown, L.J., Brunelle, J.A., Kingman, A. 1996. Periodontal status in the United States, 1988-1991: prevalence, extent, and demographic variation. *J. Dent. Res.* **75**: 672-683.

- Chung, H., Chung, C., Son, S., Nisengard, R. 1989. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in a Korean localized juvenile periodontitis. *J. Periodontol.* **60**(9): 506-511.
- Cortelli, J.R., Cortelli, S.C., Jordan, S., Haraszthy, V.I., Zambon, J.J. 2005. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J. Clin. Periodont.* **32**(8): 860–866.
- Cortelli, S.C., Feres, M., Rodrigues, A.A., Aquino, D.R., Shibli, J.A., Cortelli, J.R. 2005b. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **76**(2): 204-209.
- Dahlén, G.G., Luan, W.M., Baelum, V., Fejerskov, O., Chen, X. 1995. Periodontopathogens in elderly Chinese with different periodontal disease experience. *J. Clin. Periodontol.* **22**(3): 188-200.
- Doğan, B., Antinheimo, J., Cetiner, D., Bodur, A., Emingil, G., Buduneli, E., Uygur, C., Firatli, E., Lakio, L., Asikainen, S. 2003. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J. Periodontol.* **74**(6): 803-814.
- Gunsolley, J.C., Tew, J.G., Connor, T., Burmeister, J.A., Schenkein, H.A. 1991. Relationship between race and antibody reactive with periodontitis-associated bacteria. *J. Periodontal Res.* **26**(1): 59-63.
- Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. 1996. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 **10**: 78-111.
- Haubek, D., Dirienzo, J.M., Tinoco, E.M.B., Westergaard, J., Lopez, N.J., Chung, C-P., Poulsen, K., Kilian, M. 1997. Racial tropism in a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 3037–3042.

- Hölttä, P., Alaluusua, S., Saarela, M., Asikainen, S. 1994. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand. J. Dent. Res.* **102**(2):113-119.
- Iwase, M., Korchak, H.M., Lally, E.T., Berthold, P., Taichman, N.S. 1992. Lytic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human neutrophil cytoplasts. *J. Leukoc. Biol.* **52**: 224-227.
- Jardim Júnior, E.G., Bosco, J.M., Lopes, A.M., Landucci, L.F., Jardim, E.C., Carneiro, S.R. 2006. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo, Brazil. *J. Appl. Oral Sci.* **14**(3): 153-156.
- Joshi, V.M., and Vandana, K.L. 2007. The detection of eight putative periodontal pathogens in adult and rapidly progressive periodontitis patients: an institutional study. *Indian. J. Dent. Res.* **18**(1): 6-10.
- Kaplan, J.B., Perry, M.B., Maclean, L.L., Furgang, D., Wilson, M.E., Fine, D.H. 2001. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect. Immun.* **69**(9): 5375-5384.
- Lakio, L., Kuula, H., Dogan, B., Asikainen, S. 2002. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* proportion of subgingival bacterial flora in relation to its clonal type. *Eur. J. Oral Sci.* **110**(3): 212-217.
- Lally, E.T., Golub, E.E., Kieba, I.R., Taichman, N.S., Rosenbloom, J., Rosenbloom, J.C., Gibson, C.W., Demuth, D.R. 1989. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to homologous toxins. *J. Biol. Chem.* **264**: 15451-15456.

- Leung, W.K., Ngai, V.K., Yau, J.Y., Cheung, B.P., Tsang, P.W., Corbet, E.F. 2005. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from young Chinese aggressive periodontitis patients. *J. Periodontal Res.* **40**(3): 258–268.
- Löe, H. and Silness, J. 1963. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.* **21**: 553 –551.
- Meng, S., Wu, Y.F., Yang, H., Zhao, L., Ou-Yang, Y.L. 2007. Distribution of *Haemophilus actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis patients and periodontally healthy subjects. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* **25**(1): 42-45.
- Mombelli, A., Gmür, R., Lang, N.P., Corbet, E., Frey, J. 1999. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *J. Clin. Periodontol.* **26**(8): 505-510.
- Nonnenmacher, C., Mutters, R., De Jacoby, L.F. 2001. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**(4): 213–217.
- Papapanou, P.N. 1996. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann. Periodontol.* **1**(1): 1-36. Review.
- Rabie, G., Lally, E.T., Shenker, B.J. 1988. Immunosuppressive properties of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect. Immun.* **56**: 122-127.
- Rosalem Junior, W., Andrade, A.F.B., Colombo, A.P.V. 2006. Prevalence of leukotoxic genotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Brazilians with chronic periodontitis. *Braz. J. Microbiol.* **37**(4): 590-596.
- Rylev, M. and Kilian, M. 2008. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J. Clin. Periodontol.* **35**: 346-361.
- Saarela, M., Asikainen, S., Alaluusua, S., Pyhälä, L., Lai, C.H., Jousimies-Somer, H. 1992. Frequency and stability of mono or poly-infection by *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans serotypes a, b, c, d, or e. Oral Microbiol. Immunol. **7**(5): 277-279.

Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Seida, K., Yamada, S., Takazoe, I., Okuda, K. 1993. Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. Oral Microbiol. Immunol. **8**(3): 146-153.

Silness, J. and Løe, H. 1964. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol. Scand. **22**: 121-135.

Slots, J., Zambon, J.J., Rosling, B.G., Reynolds, H.S., Christersson, L.A., Genco, R.J. 1982. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. J. Periodontal Res. **17**(5): 447-448.

Slots, J., Feik, D., Rams, T.E. 1990. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. J. Clin. Periodontol. **17**(9): 659-662.

Suzuki, N., Nakano, Y., Yoshida, Y., Ikeda, D., Koga, T. 2001. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **39**(5): 2002-2005.

Tan, K.S., Woo, C.H., Ong, G., Song, K.P. 2001. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in an ethnic adult Chinese population. J. Clin. Periodontol. **28**(9): 886-890.

Teixeira, R.E., Mendes, E.N., Roque de Carvalho, M.A., Nicoli, J.R., Farias, L.M., Magalhães, P.P. 2006. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. Can. J. Microbiol. **52**(3): 182-188.

Thiha, K., Takeuchi, Y., Umeda, M., Huang, Y., Ohnishi, M., Ishikawa, I. Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* **22**(3): 201-207.

Tinoco, E.M., Stevens, R.H., Haubek, D., Lai, C.H., Balachandran, S., Preus, H.R. 1997. Relationship of serotype, leucotoxin gene type and lysogeny in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to periodontal disease status. *Eur. J. Oral Sci.* **105**(4): 9-14.

van der Reijden, W.A., Bosch-Tijhof, C.J., van der Velden, U., van Winkelhoff, A.J. 2008. Java project on periodontal diseases: serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and serotype dynamics over an 8-year period. *J. Clin. Periodontol.* **35**(6): 487-492.

Wu, Y.M., Yan, J., Chen, L.L., Gu, Z.Y. 2007. Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **8**(2): 121-131.

Yamamoto, M., Nishihara, T., Koseki, T., He, T., Yamato, K., Zhang, Y.J., Nakashima, K., Oda, S., Ishikawa, I. 1997. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in Japanese patients with periodontitis. *J. Periodontal Res.* **32**(8): 676-681

Yang, H.W., Huang, Y.F., Chan, Y., Chou, M.Y. 2005. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur. J. Oral Sci.* **113**(1): 28-33.

Yoshida, Y., Suzuki, N., Nakano, Y., Shibuya, K., Ogawa, Y., Koga, T. 2003. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**(3): 135-139.

Zambon, J.J. 1996. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann. Periodontol.* **1**: 879-925.

Zambon, J.J., Slots, J., Genco, R.J. 1983. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.* **41**(1): 19-27.

Tables

Table 1- Primers used for determination of *A. actinomycetemcomitans*-positive samples and for the serotyping (a-f) procedure.

Primers	Sequence 5'–3'	PCR	References
		product (bp)	
16s DNA	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTAAAT	550	ASHIMOTO et al. (1996)
Serotype a	GCAATGATGTATTGTCTTCTTTTGGGA CTTCAGTTGAATGGGGATTGACTAAAAC	428	SUZUKI et al. (2001)
Serotype b	CGGAAATGGAATGCTTGC CTGAGGAAGCCTAGCAAT	298	SUZUKI et al. (2001)
Serotype c	AATGACTGCTGTCTGGAGT CGCTGAAGGTAATGTCAG	559	SUZUKI et al. (2001)
Serotype d	TTACCAGGTGTCTAGTCGGA GGCTCCTGACAACATTGGAT	690	SUZUKI et al. (2001)
Serotype e	CGTAAGCAGAAGAATAGTAAACGT AATAACGATGGCACATCAGACTTT	211	SUZUKI et al. (2001)
Serotype f	ARAAYTTYTCWTCGGGAATG CCTTTATCAATCCAGACAGC	232	KAPLAN et al.(2001)

Table 2 – Distribution of *A. actinomycetemcomitans*-positive individuals according to gender, age and severity of chronic periodontitis

	Slight/moderate	Severe	Total
Male (mean age \pm sd)	21 (35.85 \pm 11.69)	15 (36.73 \pm 12.18)	36 (36.22 \pm 11.73)
Female (mean age \pm sd)	30 (34.40 \pm 11.23)	19 (31.89 \pm 9.52)	49 (33.42 \pm 10.57)
Total (mean age \pm sd)	51 (35.00 \pm 11.3)	34 (34.03 \pm 10.88)	85 (34.61 \pm 11.09)

Table 3 – Single and mixed distributions of serotype-specific antigen A. *actinomycetemcomitans* infection, according to the severity of chronic periodontitis

	Slight/moderate N(%)	Severe N(%)	Total N(%)
Single infection	42 (95.45)	26(83.87)	68(90.66)
a	15(35.71)	5(19.23)	20(29.41)
b	3(7.14)	3(11.54)	6(8.82)
c	23(54.76)	17(65.38)	40(58.82)
d	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
e	1(2.38)	1(3.85)	2(2.94)
f	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
Mixed infection	2(4.54)	5(16.13)	7(9.33)
a + b	0(0.00)	2(40.00)	2(28.57)
a + c	2(100.00)	3(60.00)	5(71.43)
Total	44(58.66)	31(41.33)	75(100.00)

Table 4 – Comparison of serotype frequency distribution according to periodontal diagnosis

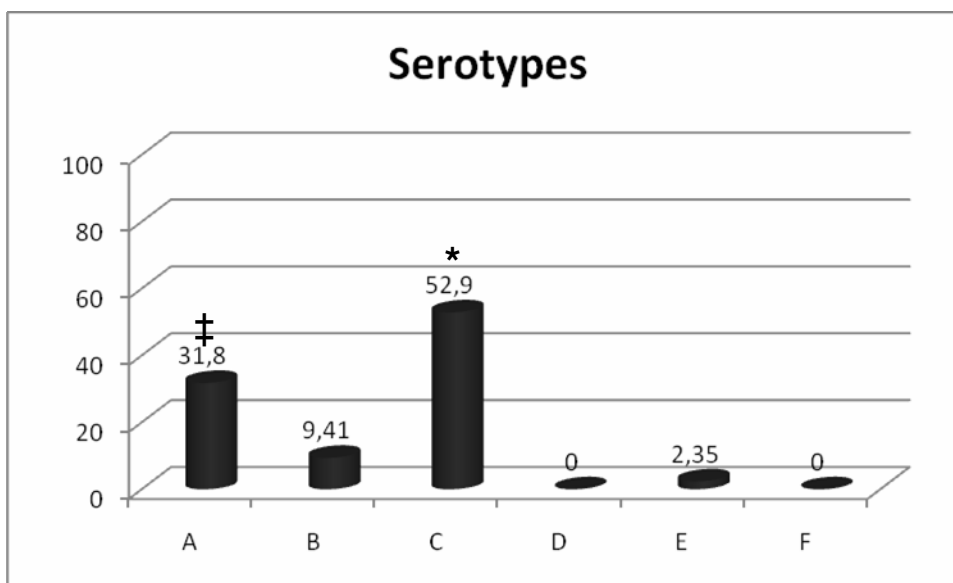
Serotypes			A	B	C	D	E	F
Chronic Periodontitis	Slight/moderate	+	17	3	25	0	1	0
		-	34	48	26	51	50	51
		Frequency	33.33%	5.88%	49.02%	0.00%	1,96%	0.00%
	Severe	+	10	5	20	0	1	0
		-	24	29	14	34	33	34
		Frequency	29.41%	14.70%	58.82%	0.00%	2.94%	0.00%
<i>p value</i>			0.7036	0.5444	0.3750	-	0.6612	-

+: number of positive subjects

-: number of negative subjects

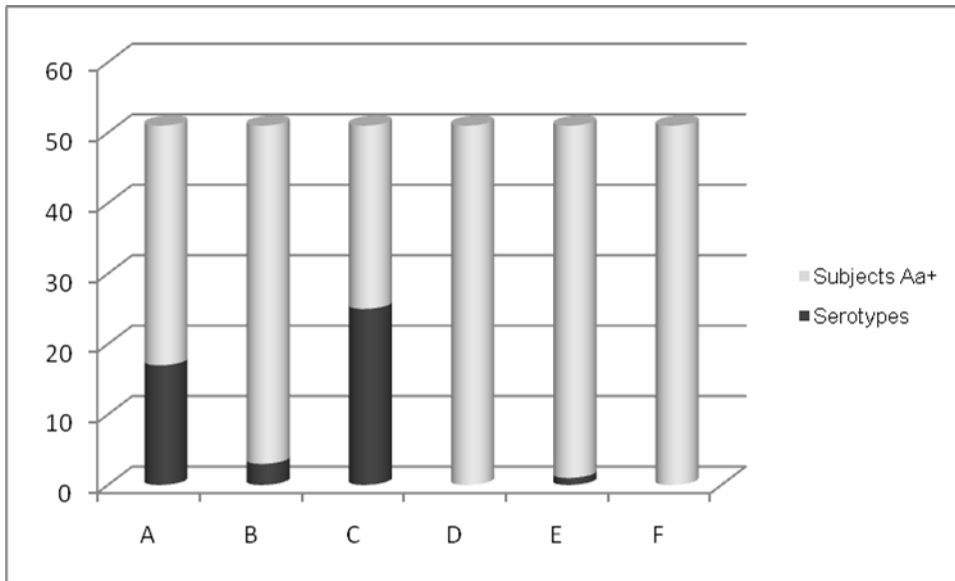
Chi-square Test – intergroup analysis.

Figures



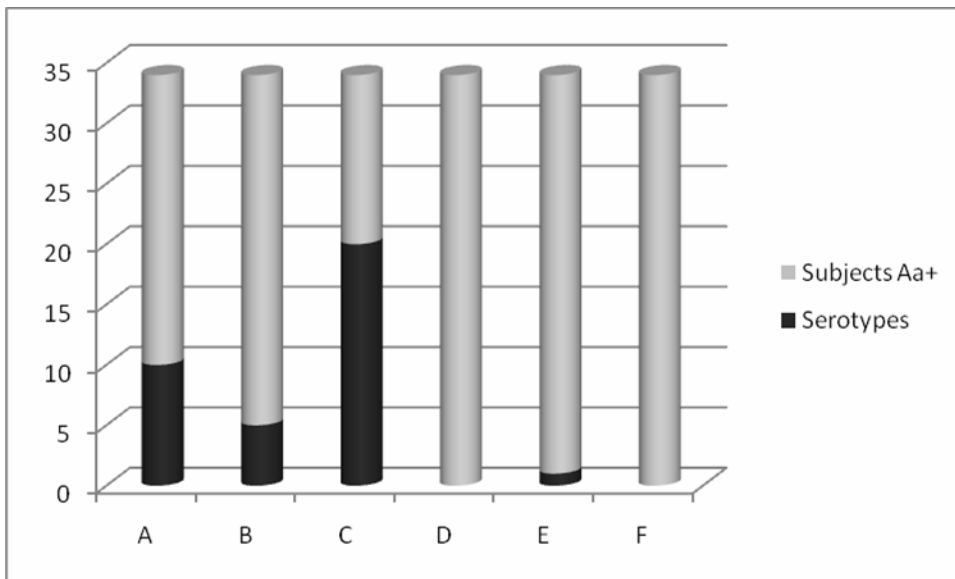
*, ‡ - Chi-square Test ($p < 0.05$)

Figure 1 - General distribution of serotypes (a-f) in *A. actinomycetemcomitans* positive subjects diagnosed with chronic periodontitis.



* - Chi-square Test ($p < 0.05$)

Figure 2 - Distribution of serotypes (a-f) in *A. actinomycetemcomitans*-positive subjects diagnosed with slight to moderate chronic periodontitis.



*, ‡ - Chi-square Test ($p < 0.05$)

Figure 3 - Distribution of serotypes (a-f) in *A. actinomycetemcomitans* positive subjects diagnosed with severe chronic periodontitis.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo pesquisa, desde que citada a fonte.

Caio Vinícius Gonçalves Roman Torres

Taubaté, Agosto de 2009