

# Presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em associação a *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em pacientes periodontais

Suzane A RASLAN<sup>a</sup>, Camila Oliveira de ALENCAR<sup>a</sup>, José Roberto CORTELLI<sup>b</sup>,  
Sheila Cavalca CORTELLI<sup>b</sup>, Davi Romeiro AQUINO<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Doutoranda em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, UNITAU – Universidade de Taubaté, 12020-330 Taubaté - SP, Brasil

<sup>b</sup>Professor Assistente, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, NUPER – Núcleo de Pesquisa Periodontal, Faculdade de Odontologia, UNITAU – Universidade de Taubaté, 12020-330 Taubaté - SP, Brasil

Raslan S, Alencar CO, Cortelli JR, Cortelli SC, Aquino DR. Presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in association with *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in periodontal patients. Rev Odontol UNESP. 2011; 40(6): 304-309.

## Resumo

**Introdução:** O conhecimento das inter-relações bacterianas e sua associação com a condição clínica periodontal podem auxiliar o manejo terapêutico. **Objetivos:** Avaliar a distribuição de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em relação a duas espécies bacterianas membros dos complexos Vermelho e Laranja, e analisar a relação entre a combinação de cepas leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* com a manifestação clínica da doença. **Material e método:** Incluíram-se 50 indivíduos (38,38 ± 10,15 anos), de ambos os gêneros, com periodontite crônica (n = 25) ou agressiva (n = 25). De cada indivíduo, amostras subgingivais foram coletadas de quatro dentes em quadrantes diferentes, com profundidade de sondagem (PS) ≥6 mm e nível clínico de inserção (NCI) ≥4 mm. Os parâmetros avaliados foram: clínicos – PS, NCI, Índice de Placa (IP-0/1) e Índice Gengival (IG-0/1) – e microbiológicos, com detecção de *A. actinomycetemcomitans* (cepas de máxima e mínima leucotoxicidades), *P. gingivalis* e *P. intermedia* por reação em cadeia da polimerase. Os dados foram estatisticamente analisados usando-se testes *t*-Student e Qui-quadrado (p < 0,05). **Resultado:** Apresentaram *P. gingivalis* 90% dos indivíduos, *P. intermedia*, 82%, e *A. actinomycetemcomitans*, 28%. *A. actinomycetemcomitans* foi mais frequente em indivíduos jovens ou com periodontite agressiva. Apenas IG apresentou maiores frequências médias (p = 0,019) quando da presença simultânea de cepas *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. **Conclusão:** Indivíduos com periodontite agressiva exibiram maiores frequências de *A. actinomycetemcomitans*. A presença de *P. gingivalis* e/ou *P. intermedia* não potencializou a patogenicidade das cepas de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade, pois tal combinação foi somente acompanhada de maior inflamação.

**Palavras-chave:** Prevalência; bactérias; periodontite.

## Abstract

**Introduction:** Knowledge of bacterial interrelationships and its association with clinical periodontal condition may help the therapeutic management. **Objective:** To evaluate the distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to 2 bacterial species members of Red and Orange Complexes; also to exam the relationship between the combined presence of *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* with clinical pattern of disease. **Material and method:** 50 (mean age 38.38 ± 10.15) subjects both gender were enrolled in the study, with chronic (n = 25) or aggressive (n = 25) periodontitis. For each subject subgingival samples were collected from 4 teeth in different quadrants showing probing depth (PD) ≥6 mm and clinical attachment level (CAL) ≥4 mm. The parameters evaluated were: clinical - PD, CAL, Plaque Index (PI-0/1) and Gingival Index (GI-0/1); microbiological – detection of *A. actinomycetemcomitans* (highly and minimally leukotoxic strains), *P. gingivalis* and *P. intermedia* by polymerase chain reaction. Data were statistically analyzed using Student *t* and Chi-square tests (p < 0.05). **Result:** 90% of the subjects harbored *P. gingivalis*, 82% *P. intermedia* and 28% *A. actinomycetemcomitans*. *A. actinomycetemcomitans* was most frequent in young or aggressive periodontitis subjects. Only GI showed

higher mean frequency ( $p = 0.019$ ) in the combined presence of highly leukotoxic *A. actinomycetemcomitans* strains, *P. gingivalis* and *P. intermedia*. **Conclusion:** Subjects with aggressive periodontitis exhibited higher frequency of *A. actinomycetemcomitans*. The presence of *P. gingivalis* and/or *P. intermedia* did not improve the pathogenicity of highly leukotoxic *A. actinomycetemcomitans* strains due to the fact that this combination was only followed by increased inflammation.

**Keywords:** Prevalence; bacteria; periodontitis.

## INTRODUÇÃO

A doença periodontal é polimicrobiana e, juntamente com outros fatores locais e sistêmicos, apresenta manifestação, gravidade e índice de progressão que diferem entre os indivíduos<sup>1</sup>.

Socransky et al.<sup>2</sup> verificaram maior frequência de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) em bolsas periodontais profundas e verificaram ainda que a frequência de *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) sorotipo *b* foi maior conforme o aumento da profundidade de sondagem, fato também verificado pelo grupo de estudo de Cortelli et al.<sup>3</sup> *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *P. Gingivalis* são reconhecidos patógenos periodontais. Adicionalmente, uma classificação da microbiota subgingival em complexos microbianos favoreceu o conhecimento das inter-relações entre as espécies subgingivais, mostrando, ainda, um aumento de bactérias dos complexos Laranja e Vermelho em indivíduos portadores de periodontite, tornando-se uma ferramenta auxiliar na interpretação e na orientação da terapia periodontal<sup>4,5</sup>. Desde então, vários estudos têm confirmado a relação entre o complexo Vermelho e a periodontite crônica. Diferentemente, embora associado a outras formas de periodontite, *A. actinomycetemcomitans* parece atuar de forma isolada quando comparado aos demais patógenos periodontais verdadeiros [*Treponema denticola* (*T. denticola*), *T. forsythia* e *P. gingivalis*] ou aqueles com nível intermediário de evidência [*P. intermedia*, *Campylobacter rectus* (*C. rectus*), *Prevotella nigrescens* (*P. nigrescens*), *Parvimonas micra* (anteriormente *Peptostreptococcus micros*), *Eubacterium nodatum* (*E. nodatum*), *Fusobacterium nucleatum vincentii* (*F. nuc. Vincentii*)]. Todavia, a existência de uma relação antagônica entre *A. actinomycetemcomitans* e tais espécies tem sido pouco explorada.

Mesmo dentro da própria espécie, parece haver pouca ou nenhuma recombinação entre diferentes clones *A. actinomycetemcomitans*<sup>6</sup>. Isso ocorre quando se considera os sete sorotipos (a-g) de *A. actinomycetemcomitans* (LPS)<sup>3,6-8</sup> ou dois padrões leucotóxicos<sup>9,10</sup>. Embora dotada de vários fatores de virulência, a patogenicidade decorre de uma complexa interação parasita-hospedeiro. Assim, além do fato de que nem todas as cepas de *A. actinomycetemcomitans* são igualmente patogênicas, outras bactérias podem contribuir para o resultado final, devendo tal interação ser determinada<sup>11</sup>. Assim, os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar a distribuição de *A. Actinomycetemcomitans* em relação a duas espécies bacterianas membros dos complexos Vermelho e Laranja em pacientes periodontais; e b) analisar a relação entre duas cepas leucotóxicas

de *A. Actinomycetemcomitans* na presença de *P. gingivalis* e *P. intermedia* com a manifestação clínica da doença.

## MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade de Taubaté – UNITAU (Protocolo 0317/07) e, dentre os indivíduos elegíveis do estudo, participaram aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A amostra do tipo conveniência foi composta por indivíduos elegíveis que procuraram atendimento na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNITAU.

Foram incluídos no presente estudo 50 indivíduos, de ambos os gêneros, com periodontite crônica ou agressiva<sup>12</sup> e que apresentaram no mínimo quatro dentes em quadrantes distintos, bolsas periodontais com profundidade de sondagem (PS) igual ou superior a 6 mm e nível clínico de inserção de no mínimo 4 mm. Foram também considerados, na seleção dos sítios, os graus de inflamação gengival. Foram excluídos indivíduos submetidos a antibioticoterapia e tratamento periodontal nos seis meses que antecederam o início do estudo, bem como diabéticos descompensados, imunossuprimidos, gestantes, lactantes e portadores de alterações hormonais.

Os parâmetros clínicos avaliados foram PS (mm), Nível Clínico de Inserção – NCI (mm), Índice de Sangramento Gengival – IG (0/1) e Índice de Placa – IP (0/1)<sup>13</sup>.

Cada dente previamente selecionado foi isolado com roletes de gaze esterilizada e o biofilme dental supragengival removido com algodão também esterilizado. Um cone de papel autoclavado, número 30 (Tanari®), foi inserido na porção mais apical da bolsa/sulco periodontal e mantido em posição por 60 segundos. Os cones de papel foram colocados em microtubos tipo Eppendorf contendo 1,5 mL de solução de Ringer reduzida e armazenados a -20 °C até o seu processamento.

Das amostras clínicas, após homogeneização mecânica, 300 µL foram centrifugados por 10 minutos à velocidade de 4690 × g. Ao material sedimentado (pellet), foram adicionados 200 µL de matriz comercial de extração e purificação de DNA (Instagene, Bio-Rad®) e seguiu-se então o protocolo do fabricante. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador (Eppendorf®) em condições e mistura padronizadas. Com a finalidade de se verificar o sucesso do processo de extração de DNA, bem como a mistura e ciclos empregados na PCR, todas as amostras envolvidas no presente estudo foram processadas inicialmente com *primers* universais. As amostras negativas foram novamente submetidas ao processo

de extração e amplificação. A partir de então, a presença de *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *P. gingivalis* foi avaliada por meio de PCR convencional. Assim, os produtos foram colocados em microtubo para PCR (Biolab®) e então levados ao termociclador, no qual 35 ciclos de amplificação foram empregados. Previamente à repetição dos ciclos, o termociclador foi mantido em 95 °C por 5 minutos. Em todos os ciclos, foi aplicada temperatura de 95 °C por 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. Após a realização de todos os ciclos, aplicou-se por mais 5 minutos a temperatura de 72 °C.

Com a finalidade de identificar duas subespécies de *A. actinomycetemcomitans* de acordo com a leucotoxicidade das amostras, foram utilizados dois *primers*<sup>9</sup>. Similarmente, dois *primers* com capacidade de identificação de espécies, mas não de subespécies, foram utilizados também para identificação de *P. intermedia* e *P. gingivalis*<sup>14</sup>.

Para a análise dos produtos amplificados pela PCR, foi empregada eletroforese em gel de agarose a 1%, constituído de 40 mL de solução tamponada e 0,40 g de agarose. A solução tamponada foi constituída de um envelope de tampão TBE (TBE buffer, Sigma®), 400 mL de água destilada e 30 µL de brometo de etídio.

O gel foi corrido a 10 V.cm<sup>-2</sup> em solução tamponada por uma hora em cuba para eletroforese (Horizon® 11-14) e analisado em câmara de irradiação ultravioleta. Marcador de peso molecular (Ladder 100 – Invitrogen®) foi empregado em todos os géis para possibilitar o estabelecimento do peso molecular do produto amplificado pela PCR.

O brometo de etídio foi responsável pela fluorescência do DNA quando da exposição à luz ultravioleta. Os géis obtidos foram fotografados e comparados com os produtos amplificados a partir de cepas padrão, cedidas pelo Instituto Fiocruz, RJ: a) *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade JP2; b) *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade 652; c) *P. intermedia* ATCC 25611; d) *P. gingivalis* ATCC 33277.

### 1. Análise Estatística

As análises comparativas foram efetuadas utilizando-se os testes *t*-Student e Qui-quadrado com auxílio do software Biostat 5.0, adotando-se nível de significância 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADO

Dos 50 indivíduos incluídos no presente estudo, 25 (50%) apresentaram periodontite agressiva ( $24,2 \pm 2,28$  anos) e 25 (50%) periodontite crônica ( $39,95 \pm 9,43$ ), tendo sido observada uma distribuição equivalente entre os gêneros.

Os valores de PS e NCI foram numericamente (mm) maiores nos indivíduos com periodontite agressiva. Fato inverso foi observado para IP e IG, em que a presença de placa e o sangramento foram maiores nos indivíduos com periodontite crônica ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

*P. gingivalis* foi detectada em 90% dos indivíduos, *P. intermedia* em 82 e 28% dos participantes exibiram *A. actinomycetemcomitans*

nas amostras subgingivais. Considerando-se o diagnóstico clínico, foi encontrada maior prevalência de *A. actinomycetemcomitans* nos indivíduos com periodontite agressiva em comparação aos diagnosticados com periodontite crônica. Essa diferença não foi observada para *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Figura 1). Embora o gênero não tenha influenciado as frequências bacterianas, a idade parece ter alguma influência, pois *A. actinomycetemcomitans* associou-se a indivíduos mais jovens (Figura 2).

Finalmente, foi proposta uma análise comparativa do comportamento dos parâmetros clínicos periodontais frente à presença de *A. Actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade associada à presença simultânea de *P. gingivalis* e *P. intermedia*, e sua presença isolada. Apenas o parâmetro Índice Gingival apresentou-se estatisticamente mais pronunciado ( $p = 0,0196$ ) no grupo com a combinação dos três patógenos. Profundidade de sondagem ( $p = 0,3688$ ), nível clínico de inserção ( $p = 0,6126$ ) e índice de placa ( $p = 0,0598$ ) apresentaram-se estatisticamente equivalentes, independentemente da associação de *A. actinomycetemcomitans* com os demais patógenos.

## DISCUSSÃO

As inter-relações bacterianas, como sinergismo, comensalismo ou antagonismo, desempenham papéis importantes no desenvolvimento e na manutenção dos membros da comunidade que o biofilme dental representa<sup>1</sup>.

Embora existam muitos estudos avaliando a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* na periodontite<sup>15,16,17</sup>, poucos estudos objetivaram analisar a presença dessa bactéria em casos de periodontites crônica e agressiva, sob a influência de outras bactérias<sup>18,19</sup>.

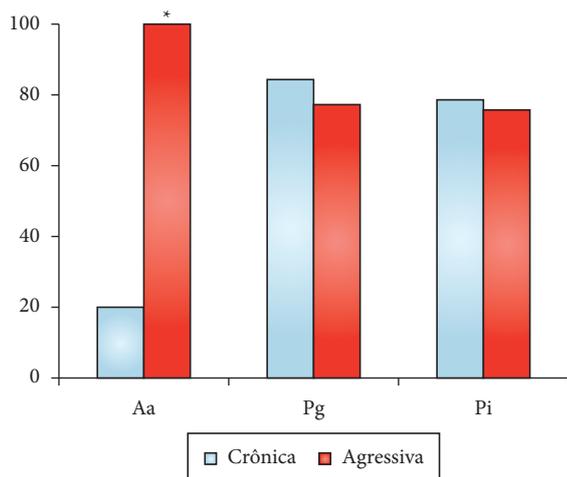
Independentemente do diagnóstico, a distribuição mostrou-se composta com uma equivalência entre os gêneros masculino e feminino ( $n = 21$  e  $n = 29$ , respectivamente). Embora o último sistema classificatório<sup>12</sup> tenha desconsiderado o fator idade, nesta população, a periodontite agressiva ( $24,2 \pm 2,28$  anos) foi observada em indivíduos mais jovens, comparativamente àqueles diagnosticados com periodontite crônica ( $39,95 \pm 9,43$  anos). Por outro lado, indivíduos com periodontite agressiva apresentaram maior destruição tecidual enquanto indivíduos com periodontite crônica exibiram maior acúmulo de biofilme e inflamação gengival, achados esses compatíveis com as características próprias de cada doença<sup>12,20</sup>. Interessantemente, as diferenças se mantiveram somente para os valores de PS e NCI, quando os sítios testes foram comparados entre os dois diagnósticos periodontais (Tabela 1). Assim, os sítios controles não diferiram entre os pacientes com periodontite crônica e periodontite agressiva.

No presente estudo, adotaram-se duas faixas etárias quando da condução da análise estatística ( $\leq 35$  e  $> 35$  anos de idade). Apesar de a idade ter influenciado o diagnóstico periodontal (periodontite crônica ou agressiva), isoladamente os parâmetros clínicos não diferiram entre esses dois grupos etários. Entretanto, indivíduos mais jovens alocaram mais *A. actinomycetemcomitans* ( $p < 0,05$ ), fato reforçado pelos dados de outros estudos<sup>9,21,22</sup>.

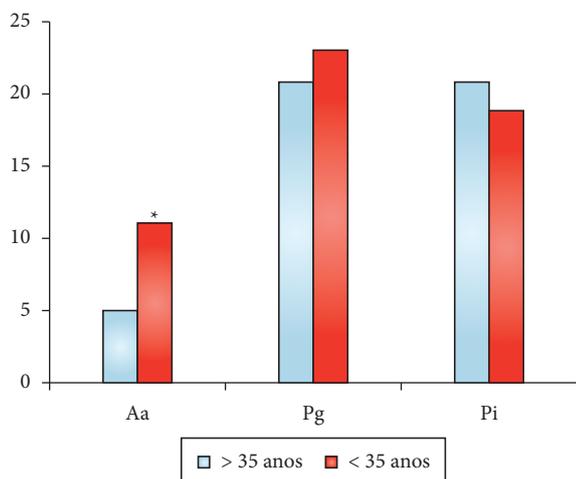
**Tabela 1.** Valores médios de Profundidade de Sondagem (PS), Nível Clínico de Inserção (NCI), Índice de Placa (IP) e Índice de Sangramento Gingival (IG), em função do diagnóstico periodontal

	PS (Média ± DP)	NCI (Média ± DP)	IP (Média ± DP)	IG (Média ± DP)
Periodontite crônica	(4,18 ± 0,74)	(3,80 ± 0,87)	(0,73 ± 0,35)	(0,63 ± 0,15)
Periodontite agressiva	(4,96 ± 1,09)	(4,43 ± 1,29)	(0,54 ± 0,14)	(0,52 ± 0,10)
p Valor	0,0231	0,03-1	0,0312	0,0432

DP – Desvio padrão; \* - Diferença estatisticamente significativa - Teste-t de Student.



\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) – Teste Qui-quadrado.

**Figura 1.** Frequência de *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Pi) em função do diagnóstico periodontal.

\* - Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) – Teste Qui-quadrado.

**Figura 2.** Prevalência de *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg) e *P. intermedia* (Pi) em função da faixa etária.

A avaliação microbiológica do estudo demonstrou uma maior frequência de *P. gingivalis* (90%) e *P. intermedia* (82%) do que *A. actinomycetemcomitans* (28%), o que parece ser compatível com o perfil periodontal da população<sup>12,23,24</sup>. Similarmente, verificou-se uma maior frequência de *A. actinomycetemcomitans* nos indivíduos com periodontite agressiva em comparação aos diagnosticados com periodontite crônica ( $p < 0,05$ ), o que também é compatível com a literatura<sup>10,20,21</sup>.

Tem-se ponderado que *A. actinomycetemcomitans* é o principal periodontopatógeno relacionado à periodontite agressiva e que a leucotoxina produzida pelo mesmo seja um dos principais fatores de virulência em função da sua capacidade de inativar a função de células do sistema imunológico humano, como neutrófilos e macrófagos. Entretanto, fatores ambientais locais, como alterações nos níveis de ferro e pH, podem influenciar a produção de leucotoxina<sup>25</sup>. Nesse sentido, as interações bacterianas podem, a essa semelhança, modificar o potencial patogênico de algumas espécies e, em consequência, modificar a própria expressão da doença. No presente estudo, avaliando-se a prevalência conjunta das bactérias, observou-se uma maior porcentagem de indivíduos apresentando uma combinação de duas espécies bacterianas (60%), seguida de três espécies (22%), de uma espécie (14%) e, finalmente, ausência das espécies testadas (4%) (dados não apresentados). Se, por um lado, esses dados confirmam a improvável detecção de espécies do Complexo Vermelho (por exemplo, *P. gingivalis*) na ausência de espécies do Complexo Laranja (por exemplo, *P. intermedia*)<sup>5</sup>, esses também parecem suportar a não interação de *A. actinomycetemcomitans* com esses mesmos patógenos. Desde a descrição dos complexos microbianos<sup>4</sup>, as interações bacterianas nas condições de saúde e doença têm sido estudadas com maior frequência. Embora relações favoráveis já estejam bem documentadas, as relações antagônicas ou o isolamento relativo de certas espécies têm recebido menor atenção. Sabe-se que algumas bactérias do Complexo Laranja contribuem para um pH mais neutro no biofilme dental, favorecendo o desenvolvimento de bactérias do Complexo Vermelho e contribuindo, assim, para o agravamento e a progressão da doença<sup>26</sup>. De acordo com o estudo de Fong et al.<sup>27</sup>, *A. actinomycetemcomitans* secreta uma molécula sinalizadora capaz de mediar as respostas interespecies, envolvendo patógenos como *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Todavia, no presente estudo, observou-se que, na presença de *P. gingivalis* e/ou *P. intermedia*, os indivíduos com cepas de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade apresentaram apenas maior grau de inflamação, mas não de destruição tecidual. Ou seja, não houve aumento de patogenicidade em decorrência da combinação bacteriana. Esses achados deverão ser confirmados por estudos longitudinais, uma vez que, com o passar do tempo, a maior resposta inflamatória observada no estudo transversal possa vir a influenciar negativamente os tecidos periodontais de suporte. Embora haja estudos que sugiram um perfil mais isolado de atuação para *A. actinomycetemcomitans*, em relação aos demais patógenos

periodontais verdadeiros, outros estudos como o de Thiha et al.<sup>18</sup> sustentam o envolvimento de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese da periodontite agressiva localizada principalmente na presença de *P. gingivalis* e *T. forsythia*, sustentando o conceito de consórcio dentro da complexa comunidade do biofilme dental.

## CONCLUSÃO

Indivíduos com periodontite agressiva exibiram maiores frequências de *A. actinomycetemcomitans*.

Neste estudo transversal, a presença de *P. gingivalis* e/ou *P. intermedia* não potencializou a patogenicidade das cepas de *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade, uma vez que tal combinação foi apenas acompanhada de maior inflamação.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio Pesquisa (Processo 07/58340-0) e pela Bolsa de Doutorado (Processo 2011/02371-0).

## REFERÊNCIAS

1. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71:653-70. PMID:18063722. PMCID:2168648. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00024-07>
2. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 766-75. PMID:1661305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1991.tb00070.x>
3. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Roman-Torres CV, Franco GC, Gomez RS, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: a two-way assessment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Oct 18. [Epub ahead of print]
4. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25:134-44. PMID:9495612. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
5. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005; 38:135-87. PMID:15853940. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
6. Kilian M, Frandsen EV, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol 2000.* 2006; 42:158-79. PMID:16930310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00159.x>
7. Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhälä L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d, or e. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7:277-9. PMID:1494451. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.1992.tb00588.x>
8. Takada K, Saito M, Tsuzukibashi O, Kawashima Y, Ishida S, Hirasawa M. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25:200-06. PMID:20536747. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00572.x>
9. 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; 17:183-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-74912003000200016>
10. Cortelli SC, Costa FO, Kawai T, Aquino DR, Franco GC, Ohara K, et al. Diminished treatment response of periodontally diseased patients infected with the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2018-25. PMID:19458180. PMCID:2708506. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00338-09>
11. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen? *Periodontol 2000.* 2010; 54:78-105. PMID:20712635. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x>
12. American Academy of Periodontology. International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4:1-6. PMID:10863370. <http://dx.doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
13. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975; 25:229-35. PMID:1058834.
14. Ashimoto AC, Chen C, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11:266-73. PMID:9002880. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.1996.tb00180.x>
15. Ready D, D'Aiuto F, Spratt DA, Suvan J, Tonetti MS, Wilson M. Disease Severity associated with presence in subgingival plaque of *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia*, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2008; 46:3380-3. PMID:18701660. PMCID:2566101. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01007-08>
16. Vieira EMM, Raslan SA, Wahasugui TC, Avila-Campos MJ, Marvulle V, Gaetti-Jardim Jr E. Occurrence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Brazilian Indians from Umutina reservation, Mato Grosso, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17:440-5. PMID:19936523. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-77572009000500017>
17. Roman-Torres CV, Aquino DR, Cortelli SC, Franco GC, Dos Santos JG, Corraini P, et al. Prevalence and distribution of serotype-specific genotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis Brazilian subjects. *Arch Oral Biol.* 2010; 55:242-8. PMID:20171609. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.01.008>
18. 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; 22:201-7. PMID:17488447. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00354.x>

19. Casarin RC, Ribeiro EP, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. J Periodontol Res. 2010; 45:635-42. PMID:20546109. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01278.x>
20. Cortelli JR, Cortelli SC. Chronic and aggressive periodontitis: Subgingival prevalence and frequency of periodontal pathogens. Rev Biociênc Taubaté. 2003; 9:91-6. PMID:10914794.
21. Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EMB, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, et al. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and others forms of early-onset periodontitis. J Periodontol. 2000; 71:912-22. PMID:18422698. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.912>
22. 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: 487-92. PMID:10914798. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01218.x>
23. López NJ. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. J Pedriodontol. 2000; 71; 948-54. PMID:11737515. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.948>
24. Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird OS, Palmer J, et al. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in an Australian population. J Clin Periodontol. 2001; 28:1163-71. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-051X.2001.281212.x>
25. Fives-Taylor P, Meyer D, Minthz K. Virulence factors of the periodontopathogen *A. actinomycetemcomitans*. J Periodontol. 1996; 67 (Suppl.):291-7. PMID:12654101.
26. Takahashi N. Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18:109-13. PMID:11705942. PMID:98856. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-302X.2003.00054.x>
27. Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, Demuth DR. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. Infec Immun. 2001; 69:7625-34. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.12.7625-7634.2001>

## AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

---

Suzane A Raslan  
Rua Expedicionário Ernesto Pereira, 110, 12020-330 Taubaté - SP, Brasil  
e-mail: suraslan@yahoo.com.br

Recebido: 02/12/2011  
Aceito: 28/12/2011