

Barbosa JMP, Cortelli JR. Presença de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de acordo com o diagnóstico periodontal, idade e gênero. *ClipeOdonto-UNITAU*. 2010; 2(1): 16-23.

Presença de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* de acordo com o diagnóstico periodontal, idade e gênero

Presence of highly and minimally leukotoxic strains of A. actinomycetemcomitans according to periodontal profile, age and gender

Janaína Maria Prata Barbosa¹

José Roberto Cortelli¹

Correspondência: prata503@terra.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e distribuição de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* em relação ao perfil periodontal, idade e gênero de uma população de moradores do Estado de São Paulo. Foram incluídos no presente estudo 100 indivíduos com amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans* com diagnóstico de Periodontite Estabelecida (PE) 1, 2 ou 3 ou Periodontite Agressiva (PA). Após anamnese, exames clínicos, incluindo mensuração de Profundidade de Sondagem, Nível Clínico de Inserção, Índices de Placa e Gengival, além de amostras microbianas subgingivais foram coletados de toda população estudada. Estatisticamente foi utilizado o teste qui-quadrado para avaliar a distribuição da frequência de *A. actinomycetemcomitans* de máxima/mínima leucotoxicidade pelas variáveis diagnóstico, gênero e idade. Dos 100 indivíduos, 49 receberam o diagnóstico de PE1, 16 de PE2, 15 de PE3 e 20 de PA. *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade foi estatisticamente maior em todos os indivíduos independentemente do diagnóstico clínico, da idade e do gênero. Diante dos resultados do presente estudo, podemos concluir que na população estudada os fatores diagnóstico periodontal, idade e gênero estiveram associados à expressão de *A. actinomycetemcomitans* somente de mínima leucotoxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: *A. actinomycetemcomitans*, periodontite, idade, gênero

ABSTRACT

This study was aimed at investigating the presence and distribution of highly and minimally leukotoxic strains of *A. actinomycetemcomitans* according to periodontal profile, age and gender in a population living in the Sao Paulo State. We included a total of 100 positive *A. actinomycetemcomitans* subjects previously diagnosed Established Periodontitis (EP) 1, 2 or 3 and Aggressive Periodontitis (AP). After we obtained demographics data, clinical periodontal examinations was performed including measurements of Periodontal Pocket Depth, Clinical Attachment Loss, Plaque and Gingival Indexes. Additionally, subgingival microbiological samples were collected from all study population. The data was statistically treated by chi-square to detect any differences between the frequency of highly and minimally leukotoxic strains of *A. actinomycetemcomitans* according to gender and age. Out of 100 included subjects, 49 were diagnosed EP 1, 16 were EP 2, 15 were PE 3 and 20 were AP. Minimally leukotoxic strains of *A. actinomycetemcomitans* were statistically higher in all study populations taken into consideration the periodontal diagnosis, age and gender. According to our results we concluded that in both EP and AP subjects strains with minimally leukotoxic was more prevalent than highly leukotoxic strains of *A. actinomycetemcomitans*. The factors such as age and gender did not interfere in this distribution.

KEY WORDS: *A. actinomycetemcomitans*, periodontitis, age, gender

¹ Universidade de Taubaté –UNITAU

INTRODUÇÃO

A. actinomycetemcomitans tem sido relatado por diferentes autores como um patógeno extremamente associado à doença periodontal destrutiva [2,3]. Trata-se de um microrganismo Gram-negativo, curto, não formador de esporos, imóvel e anaeróbio facultativo [5]. *A. actinomycetemcomitans* tem demonstrado a capacidade de invadir as células epiteliais da gengiva humana in vitro [6,7], células endoteliais vasculares humanas [8] e células epiteliais bucais in vivo [9]. Além disso, estudos têm mostrado que *A. actinomycetemcomitans* induz à morte celular por apoptose [10]. A patogenidade de *A. actinomycetemcomitans* é atribuída, entre outros fatores de virulência, a expressão de uma leucotoxina pertencente à família de proteínas RTX codificada por 4 genes designados ltxC, ltxA, ltxB, e ltxD [12,13]. Estudos têm mostrado diversidade genética de *A. actinomycetemcomitans* em amostras isoladas de populações asiáticas, européias e norte-americanas [2-4,14-18]. Essa diversidade expressa diferentes cepas leucotóxicas; a saber, cepas de máxima (amostras JP2) ou mínima leucotoxicidade (amostras 652).

No Brasil, nosso grupo já realizou alguns estudos preliminares caracterizando indivíduos diagnosticados com periodontite agressiva ou crônica em relação à expressão de leucotoxina [19,20]. Todavia, ainda poucos estudos foram conduzidos no sentido de relacionar cepas de máxima ou mínima leucotoxicidade com o perfil da doença [21,22], ou com fatores como gênero e idade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença e distribuição de cepas de máxima e mínima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* em relação ao perfil periodontal, e aos fatores idade e gênero de uma população oriunda do Vale do Paraíba-SP.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo do tipo transversal foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNITAU sob número 0390/07. Foram alocados 80 indivíduos adultos diagnosticados com periodontite estabelecida 1, 2 e 3 [23] e 20 indivíduos com periodontite agressiva [24] que procuraram tratamento clínico periodontal nas clínicas de graduação e pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté que apresentaram, após coleta microbiana, amostras positivas para o microrganismo *A. actinomycetemcomitans*.

Previamente à análise microbiana, os indivíduos foram examinados clinicamente para se estabelecer o diagnóstico periodontal. Esse exame, realizado por dois examinadores treinados e calibrados, mensurou profundidade de sondagem e nível clínico de inserção em seis pontos por dente: mesio vestibular, médio vestibular, disto vestibular, mesio lingual/palatino, médio lingual/palatino, disto lingual/palatino, com o auxílio de uma sonda periodontal manual (PCPUNC 15, Hu-Friedy, Chicago, USA). Para os índices de placa e gengival, avaliaram-se as faces dentais: vestibular, mesial, distal e lingual/ palatina.

Foram excluídos do estudo aqueles indivíduos (1) submetidos à terapia periodontal 12 meses antecedentes ao início do estudo, (2) indivíduos que haviam sido submetidos à antibioticoterapia 3 meses antecedentes ao início deste. Foram também excluídos (3) aqueles que necessitavam de profilaxia antibiótica para a realização de exame clínico periodontal e, finalmente (4), os que não apresentassem no mínimo os dentes 16, 11, 21, 26, 36, 31, 41 e 46.

As amostras bacterianas foram coletadas do sulco gengival/bolsa periodontal por meio de cones de papel autoclavado nº 30 (Dentsply, USA), das faces com maior profundidade de sondagem e maior perda de inserção clínica dos dentes 16, 11, 21, 26, 36, 31, 41 e 46. Quando da coleta microbiana, cada dente selecionado foi previamente isolado com roletes de gaze esterilizada e o biofilme dental supragengival removido com algodão esterilizado. O cone de papel foi então inserido na porção mais apical do sulco gengival/bolsa periodontal e aí mantido por 60 segundos [25]. A partir de então, os 6 cones de papel foram colocados em um único microtubo (Bio-Rad) contendo 1,5 ml de tampão TE e mantidos a -20°C até o seu processamento. Para o procedimento de extração do DNA genômico, os microtubos foram homogeneizados em agitador mecânico por 30 segundos (Vortex, Phoenix, AP56). Após essa etapa, 500 microlitros de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo previamente identificado, e este foi submetido à centrifugação por 3 minutos. Ao término do processo de centrifugação, o sobrenadante foi removido e 200 microlitros 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 30 minutos a 56°C. Em seguida, o microtubo foi novamente homogeneizado por 30 segundos e então mantido por 8 minutos em banho-maria a 100°C. Ao término deste período, a conclusão do processo de extração e purificação ocorreu pela homogeneização por 30 segundos e centrifugação por 4 minutos.

As amostras foram amplificadas por meio de pares de *primers* específicos ao gene rRNA 16S de *A. actinomycetemcomitans* (5'AAACCCATCTCTGAGTCTTCTTC3' e 5'ATGCCAACTTGACGTTAAAT3'). Para o procedimento de identificação dos genótipos de máxima leucotoxicidade (Acesso Genbank: M27399) e de mínima leucotoxicidade (Acesso Genbank: 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 de mínima leucotoxicidade, mas ausente no genótipo de máxima leucotoxicidade. Dessa forma, os produtos amplificados foram de 696bp (genótipo mínima) e 195bp (genótipo

máxima). A PCR foi realizada em termociclador tipo Mastercycler Gradient (Eppendorf) na seguinte condição: Um ciclo inicial a 95°C/5 min., 35 ciclos 95°C/30 seg., 55°C/30 seg., 72°C/1 min., e um ciclo final de 72°C/5 min. 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 60 min. 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.

RESULTADOS

Os dados do presente estudo foram tratados pelo teste qui-quadrado em que se avaliou a distribuição da frequência de *A. actinomycetemcomitans* de máxima/mínima leucotoxicidade pelas variáveis diagnóstico, gênero e idade. Foram incluídos no presente estudo 100 indivíduos com amostras positivas de *A. actinomycetemcomitans*. Ao se avaliar a distribuição dos indivíduos de acordo com o diagnóstico clínico verificamos que, 49 indivíduos receberam o diagnóstico clínico de PE 1, 16 com PE 2, 15 com PE 3, e finalmente 20 indivíduos com PA. Os dados da distribuição da população de acordo com diagnóstico e gênero estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição da população estudada de acordo com o diagnóstico periodontal e gênero

	PE1	PE2	PE3	PA	TOTAL
Masculino	25	6	9	2	42
Feminino	24	10	6	18	58
Total (MI±DP)	49 (31,57±11,30)	16 (33,31±10,96)	15 (41,67±12,41)	20 (29,20±5,82)	100 (32,89±11,12)

MI – Média de Idade; DP – Desvio Padrão; PE = Periodontite Estabelecida; PA = Periodontite Agressiva

Os resultados mais expressivos aqui encontrados mostraram um predomínio em todas as patologias periodontais da presença de *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade. Assim, *A. actinomycetemcomitans* de mínima leucotoxicidade foi significativamente maior ($p<0,05$) nos indivíduos diagnosticados com PE 1, 2 e 3 e também nos indivíduos com PA. As figuras de 1 a 4 mostram estes dados.

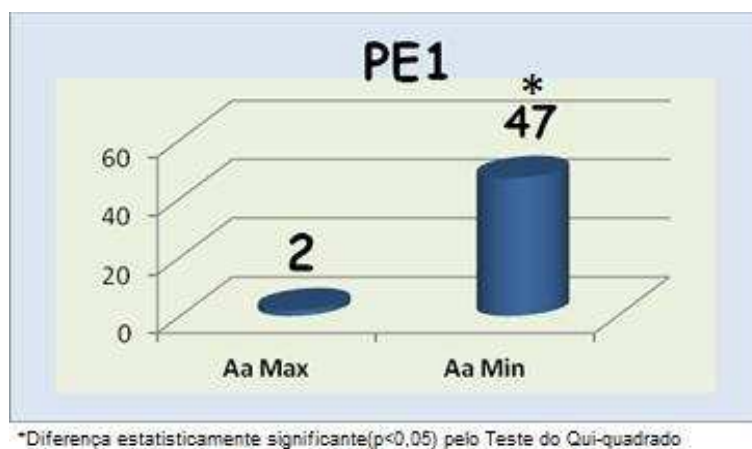
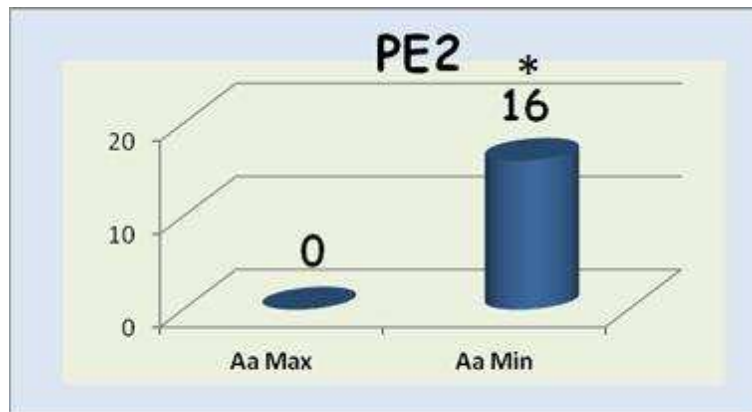
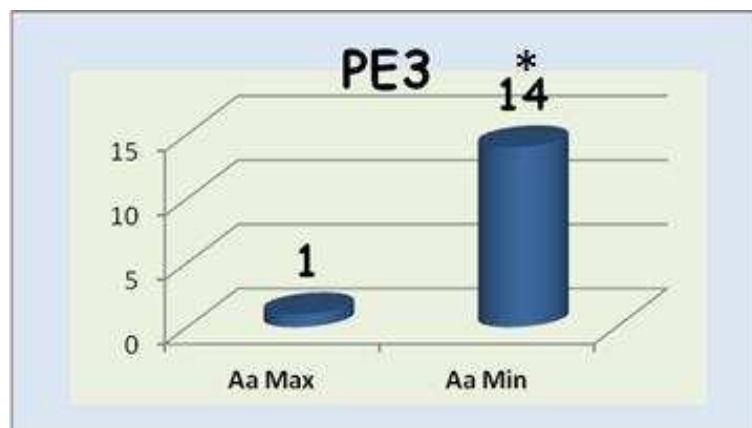


Figura 1 – Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade nos indivíduos diagnosticados com PE 1



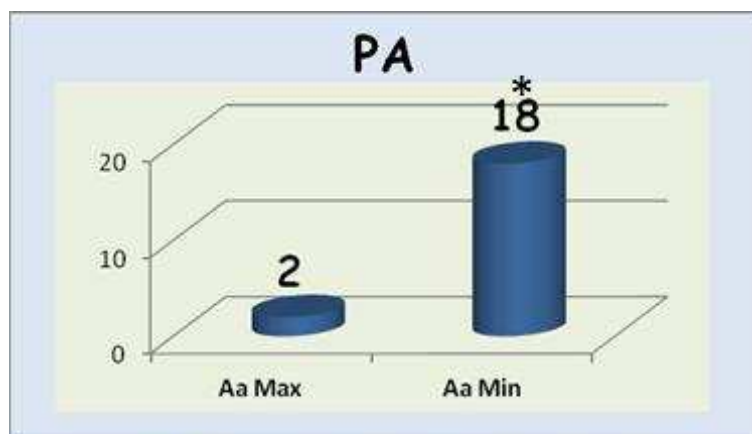
*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo Teste do Qui-quadrado.

Figura 2 - Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade nos indivíduos diagnosticados com PE 2



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

Figura 3 - Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade nos indivíduos diagnosticados com PE 3



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

Figura 4 - Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade nos indivíduos diagnosticados com PA

Na avaliação da distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de máxima/mínima leucotoxicidade em relação ao gênero, observamos que cepas de mínima leucotoxicidade foram mais frequentes nos indivíduos do gênero feminino quando comparado ao gênero masculino na figura 5.



Figura 5 – Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade de acordo com o gênero

Já na avaliação da população estudada em relação ao fator idade a média geral dos 100 indivíduos foi de $32,04 \pm 9,54$. Foram então compostos e analisados os dois grupos, um acima de 32 anos e outro abaixo. A distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de máxima/mínima leucotoxicidade de acordo com o fator idade se observa na figura 6.

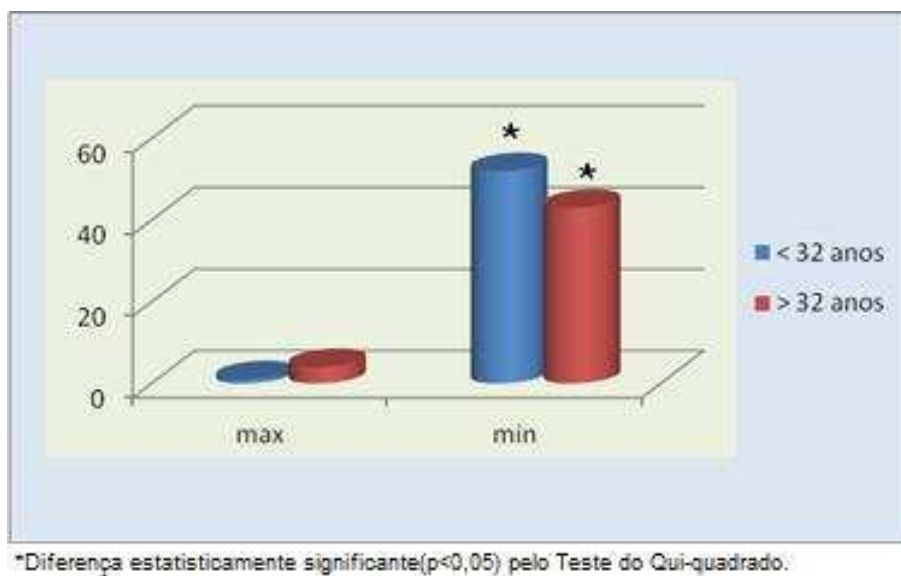


Figura 6 – Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade de acordo com a idade

Nossos dados mostraram também que a frequência de cepas de mínima leucotoxicidade prevaleceu em toda a população independentemente do diagnóstico periodontal conforme observado na figura 7.



Figura 7 – Distribuição de *A. actinomycetemcomitans* de max/min leucotoxicidade de acordo com o diagnóstico periodontal

DISCUSSÃO

A expressão leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* está presente em todas as cepas, pois se trata de uma característica genética assim, *A. actinomycetemcomitans* expressa uma leucotoxina específica que promove a destruição de linfócitos polimorfonucleares e monócitos humanos, mas é inativo contra outros tipos celulares. A leucotoxina está envolvida na patogênese periodontal inibindo mecanismos de defesa (neutrófilos) no sítio de infecção [26]. 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 regiões distintas: N-terminal, responsável pela interação celular com a membrana da célula alvo; região central, com conteúdo hidrofílico, região com agrupamentos de 9 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 [13]. Diante do exposto, este estudo teve como principal proposta avaliar a expressão leucotóxica de *A. actinomycetemcomitans* em indivíduos previamente identificados como sendo positivos para este microrganismo, todavia apresentando um perfil periodontal contemplando 4 diferentes diagnósticos. Esta distinção ofereceu a possibilidade de avaliarmos se a diferença no diagnóstico clínico poderia ter alguma interferência na expressão de cepas leucotóxicas.

Os dados do presente estudo verificaram que as cepas de mínima leucotoxicidade prevaleceram de uma forma ampla. De alguma maneira este dado foi surpreendente, pois esperávamos encontrar cepas de máxima leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* ao menos em dois grupos estudados. Nos indivíduos com PE 3 e nos indivíduos diagnosticados com PA. Sabe-se que cepas de máxima leucotoxicidade estão confirmadas na literatura [2,3,15] como sendo associadas a uma maior severidade da doença, logo esses dois grupos populacionais claramente apresentavam maior destruição periodontal sem no entanto apresentarem cepas com esta característica. Particularmente, estudos avaliando as chamadas periodontites agressivas foram associados à presença de cepas de máxima leucotoxicidade. Por exemplo, em 2000, [18], avaliaram a importância da leucotoxicidade de *A. actinomycetemcomitans* na patogênese da doença periodontal, a partir de 1023 isolados recentes por cultura bacteriana de 146 indivíduos, incluindo, 71 com periodontite juvenil localizada (denominação atual da periodontite agressiva localizada), quatro com periodontite de início precoce, 11 com periodontite pós-juvenil na forma localizada, 41 com periodontite do adulto (denominação atual da periodontite crônica) 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 6 a 65 anos de idade (média de idade de 35,47 anos). Diante dos resultados, os autores concluíram que *A. actinomycetemcomitans* de máxima leucotoxicidade foram mais frequentemente isolados de indivíduos com periodontite juvenil localizada e periodontite de início precoce, sobretudo em indivíduos jovens. Já outro estudo [27] associou a presença de *A. actinomycetemcomitans*, de máxima

leucotoxicidade, com periodontite de início precoce em crianças marroquinas. Os resultados mostraram prevalência de 60,4% de *A.actinomycetemcomitans*, dos quais 14,5% foram produtoras de máxima leucotoxicidade. Como os achados do nosso estudo diferem do que observamos na literatura, poderemos futuramente desenhar outro estudo incluindo um número maior de indivíduos com essas características para confirmar ou negar esta hipótese.

Outros aspectos que podem ser considerados referem-se ao fato de que clones de máxima leucotoxicidade podem ser mais encontrados em indivíduos com descendência africana [15,17,28]; diagnosticados com periodontites de início precoce [15,27]; indivíduos adolescentes com destacada perda de inserção clínica [3] ou ainda, que a colonização intrafamiliar desses clones sugere a ocorrência de transmissão entre membros de uma mesma família [29]. Essa comparação não pode ser feita no presente estudo, pois na nossa população os indivíduos incluídos não tinham descendência africana, apresentavam diagnóstico diferente de periodontite de início precoce e a média de idade da nossa população esteve acima do referido estudo [29].

Alguns estudos ainda caracterizam a distribuição dessas cepas, além da dependência da condição clínica periodontal do indivíduo, da interferência de fatores genéticos e ambientais [30], todavia essas avaliações não foram diretamente propostas neste estudo.

CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que, após a realização do presente estudo na população estudada, não houve distribuição uniforme de cepas de máxima ou de mínima leucotoxicidade de *A.actinomycetemcomitans*. A hipótese de que indivíduos com maior severidade da doença poderiam estar associados a uma maior frequência de cepas de máxima leucotoxicidade de *A.actinomycetemcomitans* não foi confirmada no presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores do presente estudo, nas pessoas de orientador e orientado, agradecem ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica/PIBIC a Janaína Maria Prata Barbosa.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Slots J. Salient biochemical characters of A. actinomycetemcomitans. *Archs Microbiol.* 1982; 131(1): 60-67.
6. Blix IJ, Hars R, Preus HR, Helgeland K. Entrance of Actinobacillus actinomycetemcomitans into HEp-2 cells in vitro. *J Periodontol.* 1992; 63: 723-28.
7. Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun.* 1993; 61: 1239-45.
8. 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 Immun.* 2000; 68: 5416-19.
9. Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun.* 2001; 69: 2700-07.
10. 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.
11. Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihar T, et al. Human epithelial cell death caused by Actinobacillus actinomycetemcomitans infection. *J Med Microbiol.* 2000; 49: 739-45.
12. 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.
13. 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.
14. Asikainen S, Chen C, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol.* 1995; 10(2): 65-8.

15. Haubek D, DiRienzo JM, Tinoco EMB, Westergaard J, Lopéz NJ, Chung CP, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 3037-42.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Cortelli SC, Jorge AO, Cortelli JR, Jordan SF, Haraszthy VI. Detection of highly and minimally leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in patients with periodontal disease. *Pesq Odontol Bras.* 2003; 17(2): 183-188.
20. 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.
21. 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.
22. Teixeira RE, Mendes EN, Carvalho MAR, Nicoli JR, Farias LM, Magalhães PP. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *J Clin Microbiol.* 2006; 52: 182-8.
23. Cortelli JR, Aquino DR, Cortelli SC, Fernandes CB, de 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.
24. 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 Periodontol Res.* 2008; 43(6): 627-34.
25. Roman-Torres CV, Cortelli SC, de 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.
26. Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1989 May; 57(5): 1465-9.
27. 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 Jun; 80(6): 1580-3.
28. 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.
29. 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.
30. Kolodrubetz D, Spitznagel J Jr, Wang B, Phillips LH, Jacobs C, Kraig E. cisElements and trans factors are both important in strain-specific regulation of the leukotoxin gene in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1996 Sep.; 64(9): 3451-60.