

ANTICORPOS SÉRICOS IgG ANTI-*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 E 29523 EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES CONDIÇÕES PERIODONTAIS*

SERUM IgG ANTIBODIES TO *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 AND 29523 IN INDIVIDUALS WITH DIFFERENT PERIODONTAL CONDITIONS

Izabel Regina Fischer RUBIRA**

Odila Pereira da Silva ROSA***

Regina Stela Stilac ROCHA***

Márcia Araújo dos REIS****

RESUMO

Usando a técnica da imunofluorescência indireta, foi comparada a frequência de detecção e o título de anticorpos séricos IgG específicos para as cepas Y4 e 29523 do *Actinobacillus actinomycetemcomitans* entre 5 grupos de indivíduos classificados clínica e radiograficamente como portadores de periodonto normal (jovem e adulto), gengivite, periodontite e desdentados totais. Com títulos baixos, situando-se entre 1:1 e 1:40 em 82,8% e 64,6% dos soros, para Y4 e 29523, respectivamente, foi alta a frequência de detecção de anticorpos em todos os grupos, com positivities de 87,8% e 66,6%. Não se verificou diferença estatisticamente significativa nos níveis médios de anticorpos para Y4 e 29523 entre os grupos. Todavia, ao se comparar os títulos para as duas bactérias entre si, os resultados para Y4 foram significativamente diferentes dos resultados para 29523 nos grupos normal jovem e de periodontite.

UNITERMOS

Periodontia, doenças; Imunologia; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

* Parte da Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

** Mestre em Diagnóstico Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

*** Professora Assistente Doutora da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

**** Cirurgiã-Dentista Residente do Hospital de Reabilitação de Bauru (H.R.B), Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da doença periodontal inflamatória está associado à presença da placa bacteriana madura^{19, 35}. Alguns microrganismos da placa são considerados patógenos periodontais potenciais por sua capacidade de implantar-se no sulco gengival, produzir substâncias tóxicas, invadir o tecido e possuir mecanismos que lhes permitem resistir aos fatores de defesa do hospedeiro³². Um desses microrganismos é o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A.a.*) também designado *Haemophilus actinomycetemcomitans*³³, um bacilo Gram negativo, facultativo, com três sorotipos reconhecidos (a, b e c).

O sorotipo b é o mais prevalente na periodontite juvenil localizada (PJL), periodontite juvenil generalizada (PJG) e pós-PJL, observando-se proporções semelhantes dos sorotipos a e b na periodontite e indivíduos normais⁴².

Estudos bacteriológicos, com algumas exceções, comprovam a associação do *A.a.* com a periodontite juvenil localizada, o mesmo ocorrendo com anticorpos IgG séricos dirigidos contra a cepa Y4 (sorotipo b)^{7, 9, 10, 29, 36}, havendo controvérsia em relação à cepa 29523 (sorotipo a), com relato de associação de níveis elevados com a PJL¹² ou ausência de associação^{8, 17}.

Além do seu envolvimento na PJL, o *A.a.* tem sido associado com outras formas de periodontite^{1, 20, 38} e estudos recentes^{1, 4, 34, 41} sugerem que níveis elevados de uns poucos microrganismos, entre os quais o *A.a.* podem ser úteis indicadores de periodontite ativa. Também, o encontro de altos títulos de anticorpos séricos para o microrganismo confirma sua importância em alguns casos de periodontite severa e de progressão rápida em adultos jovens^{12, 13, 27, 39}.

Esse envolvimento do *A.a.* nas alterações mais críticas do periodonto enseja uma avaliação do grau de infecção pelo microrganismo na população. Conquanto haja relatos de estudos bacteriológicos entre nós³, a inexistência de estudos imunológicos inspirou a presente pesquisa sobre a frequência de detecção e o título de anticorpos séricos IgG específicos para as cepas Y4 e 29523 do *A.a.*, em grupos de brasileiros

classificados clínica e radiograficamente como portadores de periodonto normal, gengivite, periodontite e desdentados totais.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de Sangue

Pacientes

Para a obtenção do soro foram colhidas amostras de sangue de 99 indivíduos selecionados através de anamnese, sem tratamento periodontal prévio ou doenças sistêmicas, que nos seis meses anteriores não foram submetidos a antibioticoterapia.

A classificação dos cinco grupos foi feita a partir de exame clínico e radiográfico. O exame clínico teve como base a medida da profundidade de sondagem do sulco gengival e/ou bolsa²⁸ e a verificação das condições gengivais segundo o índice gengival modificado por LOE (1967)¹⁸, usando o critério de sangramento após a sondagem e a análise de alterações na cor, forma e textura gengivais. Os grupos ficaram assim distribuídos:

- ◆ Normal adulto (N.A.) - 20 indivíduos (10 homens e 10 mulheres) entre 18 e 37 anos, com média de idade de 27,4 anos.
- ◆ Normal jovem (N.J.) - 20 indivíduos (7 homens e 13 mulheres) entre 10 e 16 anos, com média de idade de 13,1 anos.
- ◆ Gengivite (G) - 19 indivíduos (9 homens e 10 mulheres) entre 16 e 43 anos, com média de idade de 21,1 anos.
- ◆ Periodontite (P) - 20 indivíduos (10 homens e 10 mulheres) entre 22 e 59 anos, com média de idade de 37 anos.
- ◆ Desdentado (D) - 2 indivíduos (10 homens e 10 mulheres), entre 41 e 75 anos, com média de idade de 57 anos, e mais de 5 anos de extração.

Método da Imunofluorescência Indireta (IFI)

Esfregaços

As cepas Y4 (sorotipo b) e ATCC 29523 (sorotipo a) do *A.a.*, gentilmente cedidas pelo Dr. J. Slots, da Universidade de Pensilvânia (USA), foram cultivadas por 3 a 5 dias em ágar-sangue suplementado^{15, 16},

recém-preparado, incubado em jarra "GasPak" (BBL) a 37°C. As colônias foram raspadas da superfície do meio com alça de platina e suspensas em pequeno volume de salina tampão fosfato (PBS) estéril, 0,01M, pH 7,2² em tubo de ensaio de 13x130 mm estéril. A pureza da suspensão foi controlada através de uma lâmina corada pelo método de Gram.

Para a confecção dos esfregaços uma alçada da suspensão foi colocada em seis das doze áreas demarcadas em lâmina para imunofluorescência (PERFECTA). Os esfregaços finos foram secados ao ar e depois fixados pelo calor, através da passagem rápida por 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen¹⁷. As lâminas, embrulhadas em papel de seda e alumínio, foram estocadas a 0-2°C até o momento do uso²².

Antes da triagem e titulação dos soros dos pacientes foi estabelecida a diluição de 1:80, como o título de trabalho do soro de coelho anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína (LIO-SERUM).

Triagem e Titulação dos Soros dos Pacientes^{2,21}

Para a triagem dos soros dos pacientes os esfregaços de uma lâmina foram cobertos com uma gota do soro de quatro pacientes, ficando um para controle positivo (soro de PJJ) e um para controle negativo (PBS).

A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 10 minutos, em temperatura ambiente; lavadas por 2 minutos em salina tampão fosfato mais Tween20 (PBS-T)²¹ num agitador magnético (ARTHUR H. THOMAS), na posição 2.5; novamente lavadas por 15 minutos em PBS sob agitação; deixadas em repouso por 10 minutos e outra vez lavadas em água destilada por 10 minutos sob agitação. O excesso de água destilada foi

removido com papel de filtro e feita a secagem com secador de cabelos (ARNO) em baixa velocidade, sem ressecar os esfregaços.

Os esfregaços foram então cobertos com conjugado diluído em PBS - azul de Evans², a 1:80, obedecendo-se a partir daí os mesmos passos anteriormente seguidos após a colocação dos soros.

A montagem das lâminas foi feita invertendo-se cada uma sobre duas lamínulas, no centro das quais foi colocada uma gota de glicerol tamponado³⁰, pH 9,0, com pipeta de Pasteur. Retirado o excesso com papel de filtro, as lâminas foram levadas à sala de microscopia para leitura dentro de 4 horas ou mantidas em geladeira para leitura dentro de 24 horas, sempre protegidas da luz. A leitura foi feita usando microscópio (ZEISS), modelo RA-38, com luz incidente, tendo como fonte de luz uma lâmpada de halogênio, objetiva Neofluar de 100x, ocular Kpl-8x, filtro excitador BP450, filtro de barreira LP520 e divisor de feixe cromático FT510. Foi considerada significativa a reação 3+ ou 4+²¹.

Feita a triagem, procedeu-se a titulação dos soros positivos, diluídos seriadamente em PBS 0,01M, pH 7,2, a partir de 1:10, com fator de diluição 2x até a diluição de 1:160, contando sempre com um controle negativo (PBS) e obedecendo os mesmos passos da triagem.

O título dos anticorpos fluorescentes foi registrado como a maior diluição do soro que ainda produzisse reação 3+ ou 4+.

RESULTADOS

Na tabela I são apresentados os resultados da titulação dos soros para as duas cepas de *A.a.* e suas frequências nos cinco grupos. Conquanto alta a frequência de detecção de resposta imune em todos os grupos, com 87,8% e 66,6% de positividade para Y4 e 29523, respectivamente, os títulos, na vasta maioria situaram-se entre 1:1 e 1:40. Títulos acima de 1:40, só foram observados em três soros do grupo normal, um soro de periodontite e um soro de desdentado para a cepa Y4 e em dois soros de gengivite para 29523.

Resultados negativos foram encontrados em todos os grupos, variando de um a seis para a cepa Y4 e de 3 a 11 para a 29523. (tabela I)

TABELA I - títulos de anticorpos séricos IgG anti-A.a. e respectivas frequências nos grupos estudados.

grupos título	N < 16 anos		N > 18 anos		gingivite		periodontite		desdentado		total	
	Y4	29523	Y4	29523	Y4	29523	Y4	29523	Y4	29523	Y4	29523
negativo	1	9	2	3	1	5	2	11	6	5	12	33
											12,1%	33,3%
1:1	9	8	8	13	5	7	8	6	5	13	35	47
											35,3%	47,5%
1:10	2	2	6	2	5	4	2	2	2	2	17	12
											17,2%	12,1%
1:20	4	0	2	1	2	1	5	1	4	0	17	3
											17,2%	3%
1:40	1	1	2	1	6	0	2	0	2	0	13	2
											13,1%	2%
1:80	2	0	0	0	0	2	1	0	1	0	4	2
											4%	2%
1:160	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
											1%	
total	20	20	20	20	19	19	20	20	20	20	99	99

A comparação dos títulos de anticorpos séricos entre os grupos feita pelo teste de Kruskal-Wallis³¹ revelou para a cepa Y4 os valores de H= 3,655 e p= 0,4547, e para 29523, H= 7,899 e p= 0,0953, indicando inexistir diferenças estatisticamente significantes para os mesmos. No entanto, ao se comparar os resultados das duas cepas entre si, evidenciou-se diferença significativa, com H= 38,746 e p < 0,001. Comparando os resultados de cada grupo para Y4 e 29523 pelo método de Mann-Whitney³¹, dois resultados mostraram-se significantes: o do grupo normal jovem e o do grupo de periodontite, com p < 0,001 para ambos. Para verificar uma possível diferença entre os sexos, em cada grupo foi aplicado o teste de Mann-Whitney, com resultados estatisticamente não significantes (alfa = 5%).

DISCUSSÃO

Com base nos estudos bacteriológicos que, em sua maioria falam da ausência ou baixa detecção do A.a. na microbiota subgingival de indivíduos outros que não os portadores de PJJ, causou surpresa o encontro de alta frequência de soros positivos para as cepas Y4 e 29523 nos cinco grupos estudados (tabela I).

Especificamente em relação aos dados obtidos por autores que empregaram a imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos séricos, NISENGARD et al.²³ encontraram níveis negligíveis de anticorpos para Y4, tanto em indivíduos normais como em pacientes com periodontite e PJJ, enquanto LISTGARTEN et

al.¹⁷ evidenciaram níveis de anticorpos semelhantes entre os grupos normal e com periodontite, para Y4 e 29523.

Quanto às outras pesquisas sorológicas, o uso de técnicas estruturalmente diferentes da imunofluorescência indireta, como ELISA, radioimunoensaio e dupla difusão em ágar de Ouchterlony, não permite um confronto direto com os resultados obtidos. Todavia, quando tomados em conjunto, os diversos trabalhos que pesquisaram anticorpos anti-A.a. Y4 permitem visualizar que exceto para a PJJ, os dados são extremamente discretos.

Para os indivíduos normais, a porcentagem de soros positivos relatada para Y4 é baixa, no máximo de 13%^{8, 11, 14, 24, 29}, os níveis de anticorpos são baixos^{7, 23} e baixa a frequência de indivíduos com títulos altos^{5, 9}. Para os pacientes com periodontite, a porcentagem de soros positivos varia de 8,7% a 26,3%^{8, 11, 25, 26}, os níveis de anticorpos são baixos²³, sem diferir dos níveis encontrados em indivíduos normais^{12, 23}, sendo baixa a frequência de pacientes com títulos altos⁵. Além desses, pacientes com GUNA e desdentados também apresentam baixa porcentagem de soros positivos^{8, 11} e mínimos níveis de anticorpos²³. Não há dados sobre pacientes com gengivite. Embora existam menos informações na literatura sobre anticorpos para a 29523, cepa não leucotóxica do A.a., para ela há tanto menção de pouca positividade anticórpica em pacientes com PJJ¹¹, como de maior positividade entre eles¹⁴, de níveis médios de anticorpos na PJJ iguais aos dos controles^{8, 17}, de títulos elevados na PJJ¹², e, ainda, de títulos maiores que os dirigidos para Y4 e 67 (sorotipo c) em pacientes de diabetes juvenil com periodontite²⁰. Assim como para Y4, os níveis de anticorpos para 29523 em pacientes com periodontite e indivíduos normais são discretos e semelhantes^{12, 14}.

Na comparação que fizeram entre a técnica ELISA e a imunofluorescência, EBERSOLE et al.²⁶ estabeleceram títulos ≥ 1:80 pela imunofluorescência, como altos. Levando isso em consideração, apesar da pequena amostra por eles pesquisada e da subjetividade na imunofluorescência, mais o fato de que apenas sete de todos os indivíduos aqui estudados apresentaram títulos ≥ 1:80 (tabela I) e que soros de dois pacientes com PJJ examinados (não mencionados em "Material e Métodos") apresentaram títulos de 1:160 e 1:320,

respectivamente, pode-se dizer que foram encontrados títulos baixos de anticorpos anti-A.a. Y4 e 29523 em todos os grupos. Esses títulos e a frequência de detecção semelhante entre os grupos com periodonto normal, gengivite, periodontite e desdentados totais (tabela I) são resultados tão discretos quanto os encontrados na literatura.

Os níveis de anticorpos semelhantes aos normais, nos grupos com gengivite e periodontite, indicam que o A.a. aparentemente não está desempenhando papel mais destacado nos quadros periodontais. Pelos títulos baixos encontrados na maioria dos indivíduos, não foi possível determinar se existia uma infecção atual, com presença mínima do microrganismo, se a presença dos anticorpos decorreu da instalação do microrganismo num outro nicho, que não o sulco gengival e/ou bolsa periodontal⁴², se os anticorpos resultaram de reação cruzada com outros microrganismos⁴⁰, ou ainda de infecção passada, com resposta prolongada²⁰. Em relação a esta última probabilidade, o título de 1:80, considerado alto por EBERSOLE et al.⁶, foi detectado em um paciente desdentado há 20 anos. VANDESTEEEN et al.³⁷ citam o caso dos pais de 7 filhos com problemas periodontais graves, os quais, mesmo tendo perdido seus dentes há 15 e 22 anos, ainda jovens, no momento do estudo apresentavam altos níveis de anticorpos para patógenos periodontais conhecidos. Pode-se afirmar que a inclusão do grupo de desdentados trouxe uma contribuição importante, juntamente com os dois grupos normais, na definição do título diagnóstico.

A diferença significativa dos níveis de anticorpos entre as cepas Y4 e 29523, com maior detecção para a primeira nos grupos normal jovem e de periodontite, parece confirmar o observado em outras populações, da maior difusão do sorotipo b⁴⁰.

CONCLUSÕES

A pesquisa de anticorpos IgG séricos para as cepas Y4 (sorotipo b) e 29523 (sorotipo a), através da técnica de imunofluorescência indireta evidenciou :

- ◆ Alta frequência de títulos baixos de anticorpos para ambas as cepas, em todos os grupos estudados (normal adulto, normal jovem, gengivite, periodontite e desdentado), sem diferença entre os mesmos.

- ◆ Diferença estatisticamente significativa entre os títulos para Y4 e 29523 nos grupos normal jovem e de periodontite, condizente com uma presença mais frequente do sorotipo b.

ABSTRACT

Using the indirect immunofluorescence technic, the frequency of detection and titers of serum IgG antibodies to A.a. Y4 and 29523 were compared, in five groups of individuals clinical and radiographically classified according to periodontal condition as : normal (juvenile and adult), gingivitis, adult periodontitis and edentulous. A high detection of IgG anti-A.a. was observed with a positivity percentage of 87,8% to Y4 and 66,6% to 29523. However, most of the titers were low, between 1:1 and 1:40, in 82,8% and 64,6% of the sera respectively to Y4 and 29523. There was no statistical difference for the average levels of antibody titers found to Y4 and 29523 between the groups. Nevertheless, comparing the data between the strains, the results to Y4 were significantly different from the results to 29523, for two groups: juvenile normal and periodontitis.

UNITERMS

Periodontics, diseases; Immunology; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Eymar Sampaio Lopes pela colaboração na análise estatística e ao Dr. Aguinaldo Campos Júnior pela colaboração durante a colheita das amostras e exame dos pacientes. À FAPESP, pelo auxílio concedido para o financiamento de parte da pesquisa (processo 89/0493-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BRAGD, L. et al. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis : a retrospective study. *J. clin. Periodont.*, v.14, p. 95-9, 1987.
- 2-CAMARGO, M.E. *Introdução às técnicas de imunofluorescência*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1968.
- 3-CAMPOS, M.J.A. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : susceptibilidade a antimicrobianos pelos métodos de difusão em ágar e diluição em caldo. In : SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 3, Pirassununga, 1987. *Anais*. São Paulo, 1987.

- 4-DZINK, J.L. et al. Gram negative species associated active destructive periodontal lesions. *J.clin.Periodont.*, v.12, p. 648-59, 1985.
- 5-EBERSOLE, J.L. et al. Antibody response to antigens from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Y4): relationship to localized juvenile periodontitis (LPJ). *J.dent.Res.*, v.59, p. 331, 1980. /Abstract/.
- 6-EBERSOLE, J.L. et al. An ELISA for measuring serum antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodont. Res.*, v.15, p.621-32, 1980.
- 7-EBERSOLE, J.L. et al. Serum antibody response to *A. actinomycetemcomitans* (Y4) in periodontal disease. *J.dent.Res.*, v.59, p.330, 1980. /Abstract/.
- 8-EBERSOLE, J.L. et al. Human immune response to oral microorganisms. I. Association of localized juvenile periodontitis (LPJ) with serum antibody responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Clin.exp.Immunol.*, v.47, p.43-52, 1982.
- 9-EBERSOLE, J.L. et al. Humoral immune responses and diagnosis of human periodontal disease. *J.Periodont.Res.*, v.17, p. 478-80, 1982.
- 10-FARIDA, R. et al. Humoral immune response to oral Gram-negative bacteria in juvenile periodontitis. *J. dent.Res.*, v.62, p.423, 1983. /Abstract/.
- 11-GENCO, R.J. et al. Precipitating antibodies to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J. dent. Res.*, v.59, p. 329, 1980. /Abstract/.
- 12-GENCO, R.J. et al. Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontal disease. *J.Periodont.*, v.56, p. 41-50, 1985.
- 13-GUNSOLLEY, J.C. et al. Relationship of serum antibody to attachment level patterns in young adults with juvenile periodontitis or generalized severe periodontitis. *J.Periodont.*, v.58, p. 314-20, 1987.
- 14-HAMMOND, P. et al. Antibody response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: correlation with diagnosis, infection, age and serum IgG levels. *J. dent. Res.*, v. 61, p.219, 1982. /Abstract/.
- 15-HOLDEMAN, L.V.I; MOORE, W.E.C. (eds.) *Anaerobe laboratory manual*. 2nd. ed. Virginia, V.P.I. Anaerobe Laboratory, 1973.
- 16-JURGENSEN, C.A. et al. *Manual de técnicas de laboratório*. Niterói, /s.ed./, 1978.
- 17-LISTGARTEN, M.A. et al. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. *J. clin. Periodont.* v8. p. : 155-64,1981.
- 18-LÖE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J.Periodont.*, v.38, p. 610-6, 1967.
- 19-LOE, H. et al. Experimental gingivitis in man. *J. Periodont.*, v. 36, p. 177-87, 1965.
- 20-MASHIMO, P.A. et al. The periodontal microflora of juvenile diabetics-culture, immunofluorescence and serum antibody studies. *J. Periodont.*, v.54, p. 420-30, 1983.
- 21-MOUTON, C. et al. Identification of *Bacteroides gingivalis* by fluorescent antibody staining. *Ann. Microbiol.*,132 B (Paris), p.69-83, 1981.
- 22-NAIRN, R.C. (ed.) *Fluorescent protein tracing*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1969.
- 23-NISENGARD, R.J. et al. Humoral immunologic response in idiopathic juvenile periodontitis (periodontosis). *J.Periodont.*, v.51, p. 30-3, 1980.
- 24-OKUDA, K. et al. Bacteriological study of periodontal lesions in two sisters with juvenile periodontitis and their mother. *Infect. Immun.*, v.45, p.118-21, 1984.
- 25-OKUDA, K. et al. Ecological studies on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Japanese. *Bull. Tokyo dent.Coll.*, v.25, p. 1-8, 1984.
- 26-PAGE, R.C. et al. Levels of serum antibody specific for periodontal pathogens in patients with various periodontal diseases. *J. dent. Res.*, v.61, p.219, 1982. /Abstract/.
- 27-PAGE, R.C. et al. Rapidly progressive periodontitis - a distinct clinical condition. *J. Periodont.*, v.54, p.197-209, 1983.
- 28-PIHLSTROM, B.L. et al. A randomized four-year study of periodontal therapy. *J. Periodont.*, v.52, p. 227-42, 1981.
- 29-RANNEY, R.R. et al. Relationship between attachment loss and precipitating serum antibody to *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in adolescents and young adults having severe periodontal destruction. *J. Periodont.*, v.53, p.1-7, 1982.
- 30-ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H. (eds.) *Manual of clinical immunology*. Washington, A.S.M., 1976.
- 31-SIEGEL, S. *Nonparametric statistics*. New York, McGraw-Hill, 1956.
- 32-SLOTS, J.; GENCO, R.J. Black pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J. dent. Res.*, v.63, p.412-31, 1984.
- 33-SLOTS, J.; LISTGARTEN, M.A. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. clin. Periodont.*, v.15, p.85-93, 1988.
- 34-SLOTS, J. et al. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. clin. Periodont.*, v.13, p.570-7, 1986.
- 35-THEILADE, E. et al. Experimental gingivitis in man. II.A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J. Periodont. Res.*, v.1, p.1-13, 1966.
- 36-TSAI, C.C. et al. Serum neutralizing activity against *Aa. leukotoxin* in juvenile periodontitis. *J. clin. Periodont.*, v.8, p.338-48, 1981.
- 37-VANDESTEEN, G.E. et al. Clinical, microbiological and immunological studies of a family with a high prevalence of early-onset periodontitis. *J. Periodont.*, v.55, p.159-69, 1984.
- 38-VANSTEENBERGEN, J.M. et al. Comparison of two selective media for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J.clin. Microbiol.*, v.24, p. 636-8, 1986.
- 39-VINCENT, J.W. et al. Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens. *J. Periodont.*, v.56, p.464-9, 1985.
- 40-ZAMBON, J.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. clin. Periodont.*, v.12, p.1-20, 1985.
- 41-ZAMBON, J.J. Methodology and clinical significance of rapid assays for periodontal pathogens. *J. dent. Res.*, v.65, p.167, 1986.
- 42-ZAMBON, J.J. et al. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.*, 41: 19-27, 1983.