

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



Distribución gen *fimA* de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes chilenos con periodontitis crónica

Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in Chilean patients with chronic periodontitis

Miguel A. Rojas^{1*}, Jaime Jacques¹, Sebastian Molinett², Juliana N. Botelho¹, Carlos Padilla³

1. Unidad de Periodoncia, Departamento de Estomatología, Universidad de Talca, Talca, Chile
 2. Departamento de Biotecnología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca, Talca, Chile
 3. Departamento de Microbiología, Universidad de Talca, Talca, Chile

*Correspondencia a: Miguel Angel Rojas, DDS, MS, Unidad de Periodoncia, Departamento de Estomatología, Universidad de Talca | 2 Norte 685, Talca, 3465548, Maule, Chile. | Tel: +56 071220 452 | E-mail: mrojasc@utalca.cl
 Trabajo recibido el 26/01/2017. Aprobado para su publicación el 05/09/2017

RESUMEN

Antecedentes: Gen *fimA* de *Porphyromonas gingivalis* es un importante factor de virulencia asociado al desarrollo y la progresión de periodontitis.

Objetivo: Cuantificar los niveles de *P. gingivalis* y la prevalencia de genotipos *fimA* en pacientes chilenos con diferentes grados de severidad de periodontitis crónica.

Metodología: Se analizaron 135 muestras subgingivales de 45 adultos (15 con leve, 15 con moderada y 15 con periodontitis severa) mediante qPCR para *P. gingivalis* y genotipos *fimA* (I-V and Ib).

Resultados: Se detectó *P. gingivalis* en el 73,3% de los pacientes con periodontitis crónica (46,6%, 73,3% y 100% para las formas leve, moderada y severa, respectivamente). El gen *fimA* se detectó en el 66% de los sujetos positivos para *P. gingivalis*, siendo el *fimA* IV y I los genotipos más prevalentes. Además, se detectó *fimA* IV en el 75% y *fimA* I en el 62,5% de los casos severos y moderados de periodontitis, respectivamente. Los niveles aumentados de *fimA* IV se asociaron con periodontitis crónica severa.

Conclusiones: Los resultados sugieren una alta prevalencia de *P. gingivalis* y de sus genotipos *fimA* IV y I en pacientes con periodontitis crónica. Además *fimA* IV fue asociado con formas más severas de periodontitis crónica en esta población chilena.

PALABRAS CLAVE

Periodontitis crónica; Biofilm dental; Fimbrias bacterianas.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 10(3); 141-144, 2017.

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas gingivalis fimA* gene is a key virulence factor and has been associated with development and progression of periodontal diseases.

Aim: To quantify the levels of *P. gingivalis* and the prevalence of *fimA* genotypes in Chilean patients with different severity of chronic periodontitis.

Methodology: One hundred and thirty five subgingival samples from 45 adults (15 with slight, 15 with moderate and 15 with severe chronic periodontitis, respectively) were analyzed by qPCR for *P. gingivalis* and *fimA* genotypes (I-V and Ib).

Results: *P. gingivalis* was detected in 73.3% of patients (46.6%, 73.3% and 100% of patients with slight, moderate and severe chronic periodontitis, respectively). The genotype *fimA* was detected in 66% of positive subjects for *P. gingivalis*, whereas *fimA* IV and I were the most prevalent genotypes. In addition, *fimA* IV was detected in 75% and *fimA* I in 62.5% of severe and moderate cases, respectively. Increased levels of *fimA* IV were associated with severe chronic periodontitis.

Conclusions: These findings suggest that there is a high prevalence of *P. gingivalis* and its *fimA* IV and I genotypes in chronic periodontitis patients. Furthermore, *fimA* IV was associated with severe chronic periodontitis in this Chilean population.

KEYWORDS

Chronic periodontitis; Biofilms; Bacterial fimbriae.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 10(3); 141-144, 2017.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales microorganismos descritos en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal y particularmente de periodontitis crónica es *Porphyromonas gingivalis*⁽¹⁾. Se ha visto que su frecuencia varía según el grupo étnico⁽²⁾, ubicación geográfica⁽³⁾ y metodología del estudio^(4,5).

P. gingivalis es un periodontopatógeno clave en el desarrollo y progresión de la enfermedad periodontal^(1,5) debido a que sus factores de virulencia favorecen la adhesión, invasión y destrucción de los tejidos periodontales, pudiendo conducir a la formación de sacos periodontales⁽⁷⁾. Las fimbrias de *P. gingivalis* se localizan en la superficie celular y son un

factor crítico de colonización⁽⁸⁾. El gen que codifica las fimbrias es el *fimA*, se clasifica en seis genotipos (I, Ib, II, III, IV, V) en base a la secuencia de sus nucleótidos^(9,10). La prevalencia de los diferentes genotipos del *fimA* ha sido estudiada y muestra una gran variación según la población analizada⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Una serie de estudios han sugerido una mayor prevalencia de *fimA* II, seguida de *fimA* IV, en pacientes con periodontitis^(11,12,15). Estos dos genotipos han estado estrechamente asociados con la enfermedad periodontal severa⁽¹⁰⁾. Por otro lado, los genotipos *fimA* I y V se han asociado con un estado de salud periodontal⁽¹⁵⁾.

La prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes chilenos con periodontitis crónica es elevada^(4,16,17). Sin embargo, información disponible sobre los niveles de este microorganismo o su distribución según diferentes genotipos *fimA* en esta población es limitada. El objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles de *P. gingivalis* y medir la prevalencia de los seis genotipos *fimA* en pacientes chilenos con diferentes grado de severidad de periodontitis crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos. Se presenta un estudio de corte transversal. Se invitó a participar en este estudio a cuarenta y cinco sujetos (15 hombres y 30 mujeres, rango de edad de 20-75 años) con diagnóstico de periodontitis crónica y seleccionados por conveniencia según grado de severidad. Los criterios de exclusión incluyeron embarazo, tratamiento periodontal previo y antecedentes de uso sistémico o local de antimicrobianos en los seis meses previos al muestreo, además de condiciones sistémicas conocidas que pudieran influir en las condiciones periodontales. Los pacientes incluidos en el estudio tenían que presentar al menos 5 dientes presentes en boca y ser diagnosticados con periodontitis crónica según los criterios diagnósticos de *American Academy of Periodontology* en 1999⁽¹⁸⁾.

Evaluación clínica. Se registraron variables socio-demográficas, las que incluyeron edad, sexo, además de la historia médica. Se realizó un examen clínico del estado periodontal. El examen periodontal incluyó la evaluación de la profundidad de sondaje, sangramiento al sondaje y pérdida del nivel de inserción periodontal en seis sitios por diente: mesiobucal, bucal, distovestibular, distolingual, lingual y mesiolingual. Luego, los pacientes se dividieron en tres diferentes categorías de 15 sujetos cada uno según la pérdida de inserción clínica (NIC): leve (1-2 mm NIC), moderada (3-4 mm NIC) y severa (= o > 5 mm NIC)⁽¹⁹⁾.

Muestras microbiológicas y extracción de ADN genómico. Después del diagnóstico periodontal, se seleccionaron para el muestreo los tres sacos periodontales más profundos de cada paciente, eliminando el biofilm supragingival con una cureta estéril. En el caso de igualdad de profundidad de los sitios se priorizaron según el orden siguiente: molares > premolares > caninos > incisivos. Para la recolección de las muestras subgingivales se insertaron los conos de papel (cono número 35, Dentsplay Maillefer) en los tres sacos periodontales seleccionados durante 10 seg como se ha descrito previamente⁽¹⁴⁾. Luego se transfirieron los tres conos con las muestras de cada paciente inmediatamente a un tubo conteniendo el medio de transporte anaeróbico (ATM AS-911, Anaerobe Systems, Morgan Hill, CA, EE.UU.), el cual fue identificado y enviado al Laboratorio de Microbiología Oral de la Universidad de Talca. Las muestras se mantuvieron a 37° C durante 15 min, se homogeneizaron y se transfirieron alícuotas de 100 µL a tubos que contenían 300 µL de agua purificada estéril. Después se lisaron las células y se extrajo el ADN sumergiendo los tubos en agua hirviendo durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante se recuperó y se purificó usando el kit de aislamiento de ADN Ultraclean[®]15 (MO BIO laboratories Inc, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Cuantificación de *P. gingivalis* mediante PCR cuantitativa (qPCR). Para cuantificar la carga bacteriana específica de *P. gingivalis*, se amplificó mediante qPCR del gen 16S rRNA. Como templado, se utilizó el ADN genómico bacteriano obtenido desde las muestras clínicas analizadas en éste estudio. Para poder calcular el número de *P. gingivalis* en cada muestra analizada, se obtuvieron curvas de calibración amplificando el gen 16S rRNA desde plásmidos que portan como inserto este gen. Para construir este plásmido, el amplicón para el gen del 16s rRNA se obtuvo a partir del ADN genómico de la cepa de referencia *P. gingivalis* ATCC 33277. Este amplicón se insertó en plásmidos y se clonó en *E. coli* como se ha descrito previamente⁽²⁰⁾. El ADN del plásmido se extrajo mediante el kit GeneJET[®] Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) y se usó como molde para obtener las curvas de calibración utilizando el sistema qPCR Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). El rango de cuantificación de esta curva de calibración fue de 10² a 10⁹ copias para este gen, con una sensibilidad de 2,2 x 10² copias en una dilución de 19⁹. La cuantificación de *P. gingivalis* se realizó por qPCR utilizando un set de partidores específicos para amplificar 16S rRNA. Las reacciones de qPCR se realizaron a 20 µl de volumen final con 10 µL de Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 2 µL

de ADN molde y 10 µM de cada primer. Los parámetros de ciclos térmicos incluyeron desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95° C durante 15 seg y 60° C durante 45 seg. El tamaño de los productos de qPCR se confirmó por visualización del gel de electroforesis de ADN (gel de agarosa al 1,5% / bromuro de etidio) y visualización con luz UV. Además, la especificidad del amplicón se corroboró por la curva de disociación obtenida por cada qPCR realizado.

Genotipificación *fimA* mediante qPCR. Como templado para estas reacciones, se utilizó el ADN genómico bacteriano obtenido desde las muestras clínicas y partidores específicos para amplificar las genovariantes del *fimA* I, II, III, IV⁽²¹⁾, V⁽²²⁾ y Ib⁽²³⁾. Se siguieron los mismos parámetros de ciclo térmico descrito para la cuantificación de *P. gingivalis*. El tamaño de los amplicones de qPCR obtenidos se verificó por electroforesis en gel de agarosa, de acuerdo a lo descrito anteriormente. La especificidad de los productos obtenidos se comprobó mediante la curva de disociación que se generó para cada reacción realizada.

Cuantificación de *P. gingivalis* y genotipificación *fimA* mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los plásmidos que contenían los genes diana se amplificaron para crear curvas estándar para la cuantificación. El amplicón de PCR para el rRNA 16S se obtuvo a partir del ADN genómico de la cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277. Estos se insertaron en plásmidos y se clonaron en *E. coli* como se ha descrito previamente⁽²⁰⁾. El ADN del plásmido se extrajo mediante el kit GeneJET[®] Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) y se usó como molde para obtener las curvas estándar utilizando el sistema qPCR Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

La cuantificación de *P. gingivalis* y genotipificación de *fimA* fueron realizados por qPCR utilizando set de primers específicos para amplificar 16S rRNA y *fimA* I, II, III, IV⁽²¹⁾, V⁽²²⁾ y Ib⁽²³⁾. Las reacciones de qPCR se realizaron a 20 µl de volumen final con 10 µL de Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 2 µL de ADN molde y 10 µM de cada primer. Los parámetros de ciclo incluyeron desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 95° C durante 15 seg y 60° C durante 45 seg. El tamaño de los productos de PCR se confirmó por visualización del gel de electroforesis de ADN (gel de agarosa al 1,5% / bromuro de etidio) y visualización con luz UV. La cuantificación de *P. gingivalis* y gen *fimA* se realizó como se ha descrito anteriormente⁽²⁰⁾.

Aspectos éticos. Este estudio fue llevado a cabo tras la aprobación del protocolo y del consentimiento informado por parte del Comité de Bioética de la Universidad de Talca. Los individuos que participaron de la investigación firmaron, previo a los procedimientos de entrevista y examen clínico, un consentimiento informado y posterior al examen se les informó de su estado de salud periodontal.

Análisis de los datos. La frecuencia y cuantificación de *P. gingivalis* y la frecuencia de cada genotipo *fimA* con respecto a la severidad de periodontitis crónica se analizaron con prueba de Chi cuadrado. La significación estadística fue dado por p valor ≤ 0,05. Los datos se analizaron utilizando el software SPSS 15.0 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.).

RESULTADOS

El estudio fue realizado con 45 sujetos que presentaron periodontitis crónica, sus datos demográficos y parámetros clínicos son presentados en la Tabla 1. Se detectó *P. gingivalis* en 33 sujetos con periodontitis crónica (73,3%). Su distribución entre los grupos con diferentes grados de severidad de periodontitis crónica fue estadísticamente significativa (p < 0,05) (Tabla 2), observándose que *P. gingivalis* estuvo presente en 7 (46,6%), 11 (73,3%) y 15 (100%) sujetos con las formas leve, moderada y severa de la enfermedad, respectivamente. La cuantificación de este periodontopatógeno indica que el 63,6% de los sujetos positivos tenían una carga bacteriana ≥ 10⁶ células / mL (Tabla 2). Además, el 80% de los pacientes con periodontitis crónica severa presentaron una carga bacteriana ≥ 10⁵ células / mL y estaban relacionados con una mayor pérdida de nivel de inserción clínica y profundidad de sondaje. Por otro lado el 85,7% los pacientes con periodontitis crónica leve se relacionaron con recuentos bacterianos con valores ≤ 10⁶ células / mL.

El gen *fimA* se detectó en 22 (66%) de los 33 sujetos positivos para *P. gingivalis*. En 14 de estas muestras positivas para este genotipo se detectó sólo un genotipo, mientras que en las otras ocho muestras mostraron una combinación de genotipos diferentes (Tabla 3). Con respecto a la frecuencia de los genotipos *fimA*, se observó la expresión de *fimA* IV (36,4%) y *fimA* I (27,3%), siendo el primero detectado principalmente en presencia de casos severos de enfermedad periodontal (75%), lo que indica una asociación estadísticamente significativa (p < 0,05) entre este genotipo y la severidad de periodontitis crónica (Fig. 1). Por otro lado el genotipo *fimA* I fue más frecuentemente detectado en casos donde la periodontitis era moderada (62,5%). Los genotipos *fimA* III y *fimA* V no fueron detectados en esta población.

Tabla 1 Características demográficas y parámetros clínicos en relación a severidad de periodontitis crónica.

Variables	Leve (n=15)	Moderada (n=15)	Severa (n=15)
sexo (masculino/femenino)	3 M / 4 F	7 M / 4 F	7 M / 8 F
edad (años)	29,6 ± 3,3	41,5 ± 4,0	54,5 ± 7,2
Nivel de inserción clínica	2,6±0,5	4,0±0,7	6,8±1,8
profundidad de sondaje	3,5±0,7	4,2±0,7	5,5±1,8

Edad (promedio±DE); nivel inserción clínica y profundidad de sondaje (mm, promedio±DE).

Tabla 2 Detección y cuantificación de *P. gingivalis* en relación a severidad de periodontitis crónica.

		Leve n (%)	Moderada n (%)	Severa n (%)	Total n (%)
Detección	Negativo	8 (53,4)	4 (26,7)	0 (0)	12 (26,7)
	Positivo *	7 (46,6)	11 (73,3)	15 (100)	33 (73,3)
	Total n (%)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	45 (100)
Cuantificación	< 10 ⁶ cells/mL	6 (85,7)	3 (27,3)	3 (20)	12 (36,4)
	≥ 10 ⁶ cells/mL*	1 (14,3)	8 (72,7)	12 (80)	21 (63,6)
	Total n (%)	7 (100)	11 (100)	15 (100)	33 (100)

*p ≤ 0,05 entre los diferentes grados de severidad de la enfermedad determinado por test Chi cuadrado.

Tabla 3 Distribución de genotipos *fimA* en relación a severidad de periodontitis crónica.

	<i>fimA</i> genotype	Leve n (%)	Moderada n (%)	Severa n (%)	Total n (%)
Genotipo Simple	I	2 (100)	3 (37,5)	1 (8,3)	6 (27,3)
	Ib	0	0	0	0
	II	0	0	0	0
	III	0	0	0	0
	IV	0	2 (25)	6 (50)	8 (36,4)
	V	0	0	0	0
	Subtotal	2 (100)	5 (62,5)	7 (58,3)	14 (63,7)
Genotipo Combinado	I-II	0	2 (25)	2 (16,7)	4 (18,2)
	Ib-IV	0	0	1 (8,3)	1 (4,5)
	II-IV	0	0	1 (8,3)	1 (4,5)
	Ib-II-IV	0	1 (12,5)	0	1 (4,5)
	I-Ib-II-IV	0	0	1 (8,3)	1 (4,5)
	Subtotal	0	3 (37,5)	5 (41,7)	8 (36,3)
Total n (%)		2 (100)	8 (100)	12 (100)	22 (100)

Cuando una muestra presentó más de un genotipo *fimA* se detectó principalmente en formas moderadas y severas de periodontitis crónica. Observándose que la combinación más frecuente fue *fimA* I y II (18,2%) (Tabla 3). Es importante señalar que *fimA* IV se detectó con frecuencia en la periodontitis crónica severa (75%), lo que indica una asociación estadísticamente significativa (p < 0,05) entre este genotipo y la severidad de periodontitis crónica (Fig. 1).

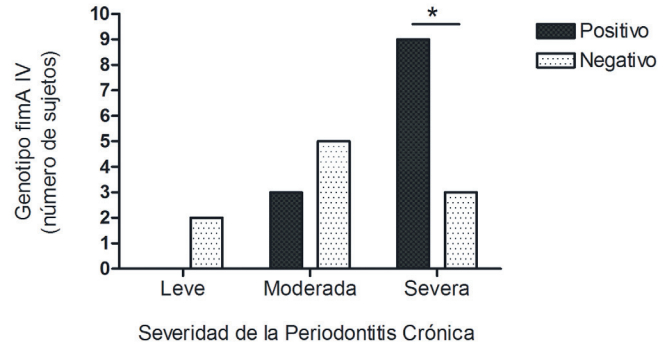


Figura 1. Distribución de genotipo *fimA* IV en relación a severidad de periodontitis crónica. * p ≤ 0.05 positivo comparado con negativo determinado por test Chi 2

DISCUSIÓN

Existe una asociación positiva entre raza / etnia y la composición de la microbiota subgingival en pacientes con enfermedad periodontal⁽²⁾. Asimismo, los resultados de la literatura sugieren que existiría una variabilidad en la frecuencia de *P. gingivalis* según la localización geográfica observada⁽³⁾. En Chile, estudios relatan mayor prevalencia de este periodontopatógeno en relación a otros países^(5,16). Sin embargo, estos estudios presentan una amplia variación en el rango de sus resultados, reportándose una prevalencia que va desde 11,9%⁽⁵⁾ a 83,8%⁽⁴⁾, en razón de los diferentes protocolos y metodologías empleadas para detectar este patógeno periodontal. El presente estudio buscó no solo detectar sino que también cuantificar los niveles de *P. gingivalis* y la distribución de diferentes genotipos *fimA* en pacientes con diferentes grados de severidad de periodontitis crónica a través de qPCR. Este método es un procedimiento preciso, sensible y específico, además de permitir la cuantificación confiable de periodontopatógenos en muestras de biofilm subgingival⁽²⁴⁾.

Nuestros resultados muestran una prevalencia de 73,3% de este patógeno en pacientes con periodontitis crónica, similar a lo reportado en estudios realizados en Brasil⁽²⁵⁾ pero superior a lo reportado en Holanda⁽²⁴⁾. Sin embargo, los niveles de *P. gingivalis* en el biofilm subgingival pueden ser más relevante que su sola detección, puesto que, según nuestros resultados, la cantidad del periodontopatógeno puede variar según la severidad de la enfermedad. De este modo *P. gingivalis* estuvo presente en el 100% de los pacientes con periodontitis severa, lo cual también fue observado en la población Coreana⁽²⁶⁾. En este mismo sentido, nuestros datos de cuantificación bacteriana mostraron que la detección de altos niveles de *P. gingivalis* (≥ 10⁶ células / ml) se asoció con un diagnóstico de enfermedad periodontal severa. Del mismo modo los pacientes con periodontitis leve mostraron niveles más bajos de *P. gingivalis* (≤ 10⁶ células / mL) lo cual parece reafirmar el rol etiológico de esta bacteria en la destrucción periodontal⁽⁶⁾.

Dentro de los factores que se relaciona directamente con el potencial de virulencia de este periodontopatógeno encontramos el gen *fimA*^(27,28), el cual es un factor de virulencia que otorga diversidad fenotípica y genotípica a las diferentes cepas de *P. gingivalis*. La prevalencia de estos genotipos cambiaría considerablemente entre las diferentes poblaciones^(13,14). Nuestro estudio busca relacionar la frecuencia de los distintos genotipos conocidos para *fimA* en función de la severidad de la periodontitis crónica. Observamos así una alta expresión de los genotipos *fimA* IV y *fimA* I (Tabla 3). Estos resultados son consistentes con los estudios que han reportado los genotipos I, II y IV como aquellos más frecuentemente detectados^(11,13). Adicionalmente nuestros resultados muestran una asociación entre la detección del genotipo *fimA* IV y la presencia de periodontitis crónica severa, coincidiendo con los resultados reportados en otros países^(20,29,30). Sin embargo, nuestro estudio contrasta con los datos de otras poblaciones en los que el genotipo más frecuente sería el *fimA* II^(11,13,14,20,21,31,32). Estas variaciones pueden ser atribuidas a patrones étnicos y / o geográficos particulares^(11,14). Finalmente, una combinación de diferentes genotipos *fimA* fue detectada en el 36,3% de los pacientes (Tabla 3); destacando que en siete de los ocho pacientes con genotipos combinados se observó la presencia del *fimA* II. Esto se relacionó frecuentemente con periodontitis crónica moderada o severa.

Un dato interesante es el hecho de que no se detectaron genotipos *fimA* en el 34% de las muestras positivas para *P. gingivalis*. Este número es mayor que los reportados anteriormente^(14,15) y podría sugerir la presencia de un genotipo *fimA* no identificado. Las muestras no identificadas

se relacionaron principalmente con periodontitis crónica leve, lo que confirmaría la importancia de este gen como factor de virulencia en la patogénesis y progresión de la enfermedad periodontal en la población chilena. Asimismo, otro rasgo que podría caracterizar nuestra población podría ser la ausencia de fenotipos *fimA* III y V.

Este trabajo muestra que los sujetos chilenos presentan una alta prevalencia de *P. gingivalis*, siendo el genotipo *fimA* IV el más frecuentemente detectado. A fin de confirmar estos resultados preliminares se sugiere la realización de estudios longitudinales con un mayor número de pacientes. Por otro lado, se recomiendan estudios adicionales en los que se pueda evaluar los diferentes genotipos y su interacción con otros factores de virulencia de este periodontopatógeno.

CONCLUSIONES

La población estudiada presenta altos niveles de *P. gingivalis* y una alta frecuencia de detección para el genotipo *fimA* IV, presentándose

con mayor frecuencia en pacientes con periodontitis crónica severa. Se evidenció la variabilidad genética de este microorganismo según la severidad de la enfermedad periodontal, siendo aspectos a considerar en la etiopatogenia y en la terapia de la enfermedad periodontal.

CONFLICTO DE INTERÉS

Todos los autores declaran no presentar conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Prof. Nora Silva, docente del área de microbiología oral del Dpto. de Patología y Medicina Oral por proporcionar cepas de *P. gingivalis* y Olga Lobos por la ayuda con los procedimientos en el laboratorio de Microbiología, Universidad De Talca.

Bibliografía

1. Slots J, Ting M. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontol 2000. 1999;20:82-121.
2. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. J Clin Periodontol. 2008;35:346-61.
3. Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellemijn-Kippuw N, Simón R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. Eur J Oral Sci. 2000;108:383-92.
4. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol. 2008;35:106-13.
5. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. J Clin Periodontol. 2004;31:996-1002.
6. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002;28:12-55.
7. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to Actinobacillus actinomycetemcomitans: a model for infectious diseases. Periodontol 2000. 2006;42:114-57.
8. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of Porphyromonas gingivalis. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1244-63.
9. Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, et al. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. J Periodontol Res. 2002;37:425-32.
10. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. J Periodontol Res. 2004;39:136-42.
11. Zhao L, Wu YF, Meng S, Yang H, OuYang YL, Zhou XD. Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. J Periodont Res. 2007;42:511-17.
12. Puig-Silla M, Dasi-Fernández F, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17:e1047-53.
13. Beikler T, Peters U, Prajaneh S, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotypes in Caucasians. Eur J Oral Sci. 2003;111:390-4.
14. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MP. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:224-9.
15. Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* and periodontal health status. J Dent Res. 2000;79:1664-8.
16. López NJ, Socransky SS, da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. J Periodontol. 2004;75:717-25.
17. Gajardo M, Silva N, Gómez L, León R, Parra B, Contreras A, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. J Periodontol. 2005;76:289-94.
18. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4:1-6.
19. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP, Flemmig T, et al. Consensus report: Chronic periodontitis. Ann Periodontol. 1999;4:38-38.
20. Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, de Faveri M, Simionato MR, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2009;36:482-7.
21. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol. 1999;37:1426-30.
22. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. J Clin Microbiol. 2000;38:1909-14.
23. Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S, et al. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. J Periodont Res. 2002;37:425-32.
24. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J Clin Microbiol. 2003;41:4950-4.
25. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilian with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005;32:860-6.
26. Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS, et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. J Periodontol 2000. 2000;71:1387-94.
27. Loos BG, Van Winkelhoff AJ, Dunford RG, Genco RJ, de Graaff J, Dickinson DP, et al. A statistical approach to the ecology of *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res. 1992;71:353-8.
28. Zhang YJ, Yasui S, Yoshimura F, Ishikawa I. Multiple restriction fragment length polymorphism genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in single periodontal pockets. Oral Microbiol Immunol. 1995;10:125-8.
29. van der Ploeg JR, Giertsen E, Lüdin B, Mörgeli C, Zinkernagel AS, Gmür R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* genotypes in dental plaque. FEMS Microbiol Lett. 2004;232:31-7.
30. Griffen AL, Lyons SR, Becker MR, Moeschberger ML, Leys EJ. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. J Clin Microbiol. 1999;37:4028-33.
31. Fabruzi S, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Variability of the *fimA* gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013;18 e100-5.
32. Nadkarni MA, Chhour KL, Chapple CC, Nguyen KA, Hunter N. The profile of *Porphyromonas gingivalis* kgp biotype and *fimA* genotype mosaic in subgingival plaque samples. FEMS Microbiol Lett. 2014;361:190-4.