

한국인에 있어서 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 가족내 전이양상에 관한 연구*

정영인 · 김성조 · 최점일

부산대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

치주질환은 특이한 치주세균의 감염과 증식이 관련되어 시작되고 진행된다^{1,2,3)}. 따라서 치주질환의 원인을 이해하는 데 있어 세균의 전달 경로 및 구강내 획득경로를 이해하는 것은 중요하다.

치주독성세균중 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*(Aa)는 그람음성, 통성, 호이산화 탄소성 간균으로서⁴⁾ 다양한 형태의 치주질환에서 검출되는 주 병인균의 하나다^{5,6)}. 많은 연구에서 국소성 유년형 치주염의 가장 중요한 원인균으로 제시되어 왔으며⁷⁻¹⁰⁾, 급속진행형 치주염과 성인형 치주염, 그리고 난치성 치주염 환자에서도 우세하게 검출되는 균들중의 하나로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 그러나, 동시에 유치열기 어린이나 건강한 10대의 치은열구에서도 자주 발견되며^{15,16)}, 그래서 정상적인 구강세균총에 속한다고 제시되기도 하였다¹⁷⁾. 건강한 치은부위나 치주적으로 건강한 개체의 세균총에 있어서의 낮은 비율로 발견된다는 사실은 Aa의 기회감염적인 성질을 보여주기도 한다^{15,16,18,19)}. 또한, 최근에는 Aa가 외인성 요인으로 감염된다고 하는 주장도 있었고^{20,21)} 이는 Aa의 전이

(transmission)를 이해하는데 기본이 되는 중요한 연구결과들이다.

치주질환 심도와 혈청형과의 상관관계에 대한 연구를 살펴보면 김 등²²⁾은 Aa의 혈청형과 유전자형 분포와 치주질환 심도와의 관계에 대한 연구를 통해 혈청형 b와 2종류의 유전자형이 부위별로는 가장 깊은 치주낭 깊이, 환자별로는 평균부착소실이 높은 환자와 관련이 깊다고 했으며, Asikainen 등³⁷⁾은 특정한 Aa clone이 치주질환과 밀접하게 관련되어 있음을 보고하였다. 허 등³³⁾은 13Aa의 임상분리 혈청형에 따른 유전자 지문양상에 관한 연구에서, 혈청형의 분포는 c, a, b의 순으로 빈도가 높게 나타났다. 각 유전자형별 출현빈도도 보고한 바 있다.

임상분리종이 같은 혈청형으로 판명된다 하더라도 각각의 유전자형은 상이할 수 있는데, 이는 유전자표지자(DNA probe)를 이용한 유전자지문법(DNA fingerprinting)에 의한 제한 절편장 다변화기법을 이용하여 판정할 수 있다. 이외에도 유전자 지문법은 세균의 검증, 동정, 질환심도와의 관계, 가족내 전이양상, 세균의 역학조사 등에 널리 이용될 수 있다. DiRienzo 등³⁰⁾은 특정표지자를 이용한 유전자지문법을 Aa

* 본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제 연구비에 의해 지원되었음.

역학과 유전학적 연구에 사용한 결과 한 개체 내에서는 하나 이상의 유전자형을 가진 Aa균이나 변이종이 검출되었고, 같은 가족내의 여러 구성원내에는 서로 다른 변이종이 존재할 수 있음을 보고하였다. 한편, Saarela 등³⁰⁾도 rRNA 유전자 표지자를 사용하여 혈청형 a, b, c, d, e의 교잡양태를 살펴보았을 때 ATCC 표준혈청형 a, b, c를 나타내는 표준균주는 각각 명확히 구분되는 제한절편장다변화를 보였으나, 혈청형 d와 e에 해당하는 IDH 781과 IDH 1705는 아주 유사하여 서로 분별하기 어렵게 나타났다고 하였다. 임상 검출균주를 살펴볼 때 동일한 개체내 서식하는 동일한 혈청형의 세균은 서로 같은 유전자형으로 판정되었으나, 인지되는 절편의 양상이 다양하여 유사한 유전자형간에 상호 구분하기는 곤란하였다고 하였다. 현재까지의 연구는 표준혈청형이나 임상분리종에 대한 유전자형을 판별하거나 세균의 역학적 및 전이연구에서 제한효소 절편형태만을 이용하였거나 rRNA 표지자만을 이용하였기 때문에 그 분석결과를 명확하게 판별하기는 어려웠다. Aa의 분자유전학적인 연구를 위한 적합한 유전자표지자가 없었고, 동시에 이 표지자를 이용하여 임상분리종에 대한 유전자형 연구를 시행한 연구가 미흡하였다. 더구나 단위집단내 또는 가족간의 세균획득과 전이에 대한 연구가 부족하였다.

따라서, 본 연구는 부산대학교 치과대학 치주과에서는 환자에서 검출된 Aa를 대상으로 Aa 분리종, 혈청형별 유전자형 연구, 치주질환심도와의 관련성, 가족내 전이양상연구를 포함한 일련의 분자유전학적 연구계획의 일환으로 이 세균의 가족내 전이양상 연구에 초점을 맞추어서 시행하였던 바, 유전자표지자를 이용한 제한절편장다변화 양상을 파악하여 가족일원의 Aa 유전자형과 이 세균의 가족내 전이양상을 파악할 목적으로 시행되었다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

분자유전학적 연구계획에 김, 허가 시작환

총 21명 중에서^{32,33)} 가족간의 연구가 가능했던 16명을 연구 대상으로 하였는데, AAP(미국 치주학회) 기준에 따라 성인형 치주염과 급속 진행형 치주염으로 분류하고, 성인형 치주염 환자 3명(초기 치주염 2명, 중등도 치주염 1명), 급속 진행형 치주염 환자 4명, 국소 유년성 치주염 환자 1명등 도합 8명의 환자와 그 가족원 8명(초기 성인형치주염 1명, 중등도 성인형치주염 4명, 급속진행형 치주염 3명)을 포함한 16명으로 임상 분리 균주 37개를 배양하여 randomly cloned된 4.7kb표지자로 교잡된 양상을 제한절편장다변화(Restriction fragment length polymorphism)로 분류하였다. 기본 유전자형 분류지표로 ATCC표준혈청형 a, b, c와 Finland 표준혈청형 d, e에 대한 유전자형을 각각 A, B, C, D, E로 정하였다. 이 다섯가지 유형에 속하지 않는 것은 미분류형(Non Type : NT)로 규정하였다.

이들 환자의 평균 연령은 36.1세(20세-65세)이고 이전 6개월간 항생제 투여 경력이나 치주치료 경험이 없는 사람을 대상으로 하였다.

2. 세균 채취와 동정

가. 표본 채취 및 배양

임상검사후 다음의 판정 기준 순서로 미생물 채취를 위한 네개의 치주낭을 선택했다.

- (1) 탐침출혈과 가장 많은 부착소실 양을 보이는 가장 깊은 열구
- (2) 부착소실이 없다면, 탐침출혈이 보이는 가장 깊은 열구
- (3) 탐침출혈이 없다면, 가장 깊은 열구
- (4) 얇고 건강한 열구만 존재한다면, 제1대구치의 근심면을 선택했다.

멸균된 paper point와 소독된 curette으로 치은연하 치태를 채취했다. 채취된 치태를 1ml reduced transport fluid(RTF : Loesche 등)³⁰⁾가 포함된 vial에 넣은후 Vortex mixer로 30초간 분산한 다음 10배을 연속희석을 하였다. Aa 선택배지상에 도말한 다음 5일간 37°C 이산화탄소 jar 배양기에서 배양했다. 20-100개의 집락을 가지는 적절한 배지를 선택하여 순수 배양을 계속하였다. 배지의 절반에 형성된 집

Table 1. Type strains and plasmid

Type strains	Relevant properties	Source
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29523	serotype a	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC29522	serotype b	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC43719	serotype c	ATCC
<i>A. actinomycetemcomitans</i> IDH781	serotype d*	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> IDH1705	serotype e*	

* Collection of Institute of Dentistry, University of Helsinki, Finland.

Plasmid	Relevant properties	Source
pAA2097 Tc ^R Am, including randomly cloned probe DiRienzo, M.J.		

락은 일차적인 DNA 조작에 이용하고 나머지는 0.15% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 넣어 -70°C에 냉동저장하였다.

나. 미생물 동정

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, *Aa* 동정의 첫번째 기준은 한천에 부착된 작고 둥글며 볼록하고 별모양의 내부구조를 가진 집락형태와 catalase 반응(3% H₂O₂)에 양성인 것으로 하였다. 그의 생화학적 검사로 oxygenase 검사, nitrate 환원 검사, indole 검사, p-nitrophenyl-alpha-D-glucosidase(ADG) 검사를 실시하였다.

3. *Aa* 분리종의 혈청형 결정과 유전자 표지자에 의한 유전자형 결정

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, 표준 균주로 *Aa* 혈청형 a(ATCC 29523), b(ATCC 29522), c(ATCC 43719)와 혈청형 d(*IDH 781*, Institute of Dentistry, Univ. of Helsinki, Finland) 및 e(*IDH 1705*, Institute of Dentistry, Univ. of Helsinki, Finland)를 사용하였다(Table 1).

LB를 사용해서 *Escherichia coli* strain DH5 α의 배양할때 37°C-이산화탄소 배양기를 이용했다. 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin (50μg/ml), tetracyclin(25μg/ml) 등에 첨가하여 사용하였다. 이 실험에 사용한 표준균주와 plasmid를 표 1에 정리하였다.

가. 혈청형의 결정(Serotyping)

(1) 항혈청(Antisera)의 준비

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, *Aa* 균주 ATCC 29523(serotype a), ATCC 29522(serotype b)와 ATCC 43719(serotype c)에 대한 항혈청은 Zambon 등⁵⁾의 방법에 의해 준비하였다.

배양된 각 균주들을 현탁하여 세균현탁액 0.2 ml와 동량의 complete Freund adjuvant 혼합물들을 토끼 발바닥에 처음 주사하였다. 일주일 후 adjuvant 없이 세균현탁액만 토끼 귀 정맥에 주사하였고 이 과정을 2주 더 계속하였다. 5주째 토끼의 심장에서 채혈하여 3000rpm으로 10분간 원심 분리한 후 혈구를 제거한 상등액을 취해 -20°C에서 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

(2) 면역흡착(Immunoabsorption)

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, 위에서 얻은 항혈청을 다른 *Aa* 혈청형 균주들의 세포로 흡착시켜 특이항원만 반응하게 하였다. 흡착시 한 종류의 토끼 항혈청 1ml에 다른 serotype 균주들(약 100mg)를 첨가하여 37°C에서 진탕하면서 1시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 12시간 유지하였다. 이 혼합물을 13,000rpm으로 60분간 원심분리하여 상등액을 -70°C에서 보관하였다.

(3) ELISA에 의해 혈청형(serotyping) 결정

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명

하자면, 혈청형을 결정할 분리된 *Aa* 균주들을 적정하게 현탁한 후, 이 항원현탁액을 ELISA용 microtitre plate의 각 well씩 첨가하여 2시간 동안 상온에 방치하고 3번 증류수로 세척하여 blocking buffer(0.05% Tween 20에 녹인 0.25% BSA)를 전 well에 가득 첨가한 후 4°C에서 12시간 보관하였다. 그후 3회 증류수로 세척한 후 PBS에 희석된 흡착된 특이 혈청형 항체 50 μ l 각 well에 첨가하여 상온에서 2시간 반응시키고, 3번 증류수로 세척한 후 goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugat를 50 μ 씩 각 well에 첨가하였다. 2시간 후 증류수로 3번 세척하여 기질 *p*-nitrophenyl phosphate액(1 mg/10ml : 0.05mM NaCO₃, pH 9.8 with 1mM MgCl₂) 50ml를 각 well에 첨가하여 반응시켰고, 1N NaOH를 사용하여 반응 정지를 시켰다. 발색도를 microELISA reader로 spectrophotometer 파장 405nm에서 흡광도로 판정하였다.

나. 유전자형의 결정(Genotyping)

1) 표지자 준비(Probe Preparation)

(1) Transformation

김과 허^{32,33}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, 표지자로 사용할 plasmid pAA2097은 Dr. DiRienzo³⁰(Univ. of Pennsylvania)가 기증한 것으로 host *E. coli* DH5 α 에 도입해 증폭하여 사용하였다. competent cell과 DNA의 도입은 Hanahan의 방법에 따라 수행하였다.

E. coli DH5 α 를 37°C에서 2X 10⁸ cells/ml되게 진탕 배양한 후, 배양액을 얼음속에서 10분간 냉각하고 냉동원심분리기에서 4°C에서 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 집균하였다. 세포침전물에 미리 차게 해둔 멸균된 CaCl₂용액(50mM CaCl₂, 10mM Tris-Cl pH 8.0)을 원래 배양액 부피 1/5정도로 첨가한 다음, 세포를 현탁시켜 얼음속에 15분동안 두었다가 5,000으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 미리 차게 해둔 CaCl₂용액으로 원래 부피의 1/50되게 현탁시킨 후, 차게 해둔 effendorf tube에 competent cell 0.2ml씩 분주하여 사용하였다.

competent cell 0.2ml과 plasmid DNA solu-

tion 0.1ml를 혼합하여 0°C에서 60분간 방치한 후, 42°C에서 2분간 열충격을 가하고 LB 배지를 0.8ml씩 각 반응물에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 흔들지 않고 배양하였다. 이 배양액을 선택배지 tetracyclin과 ampicillin이 첨가된 LB agar plate에 적당히 희석시켜 도말하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 colony를 확인하였다.

(2) Plasmid DNA의 분리 및 정제

김과 허^{32,33}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, plasmid DNA의 분리와 정제를 위해, small scale DNA 분리와 large scale DNA 분리방법은 Maniatis 등⁴¹의 방법을 사용하였다. 항생제를 포함하는 LB medium 5ml에 균을 접종하여 37°C에 하룻밤 배양한 후, LB medium 500ml에 1 : 100비율로 접종하여 하룻밤동안 배양하였다. 이 배양액을 4°C, 5,000rpm의 속도로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고, STE buffer(pH 8.0)로 1회 세척하였다. 세척된 균체에 lysozyme(50mg/ml)을 포함하는 용액 I 10ml에 균체를 현탁시키고 상온에 5분간 방치하였다. 이 혼합액에 용액 II 20ml를 첨가하고 tube의 입구를 밀봉한 후 부드럽게 여러번 뒤집고 10분간 얼음속에 방치하였다. 용액 II를 처리한 혼합액에 얼음속에 냉각된 용액 III 15ml를 첨가하여 여러번 빨리 뒤집고 10분동안 얼음속에 담가둔 후 4°C, 15,000rpm(한일 H50 A-6, Rotor A10H-24)으로 30분동안 원심분리하여 잔여 세포와 염색체 DNA가 제거된 상등액을 부피의 0.6배 양의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 15분동안 상온에 방치하였다. Isopropanol이 첨가된 용액을 꺼내어 상온에서 10,000rpm에 30분동안 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버리고 침전물을 얻었다. 70% ethanol로 상온에서 1회 세척하고 원심분리하여 상등액을 버리고 DNA 침전물을 얻었다. TE (pH 8.0) buffer 8ml에 침전물을 녹이고 CsCl 8g을 넣어 완전히 녹인 후, ethidium bromide 용액(EtBr, 10mg/ml in H₂O) 0.8ml을 첨가하였다. CsCl과 EtBr이 첨가된 DNA 용액을 20°C, 55,000rpm으로 20시간동안 초원심분리(Kontron T-2000)하여 plasmid DNA를 분리하였다. TE-buffer saturated isoamyl alcohol을

사용하여 붉은색이 없어질 때까지 ethidium bromide를 제거하였다. plasmid DNA 용액을 dialysis tube에 넣고 TE(pH 8.0) buffer 1L에 dialysis(4°C, 3시간씩 3회 완충액교환)를 하여 CsCl를 제거한 다음 DNA 농도를 측정하여 -20°C에 보관하였다.

(3) Agarose gel electrophoresis

Plasmid DNA를 확인하는 모든 실험은 0.7% agarose gel에서 대개 5V/cm에서 3시간 동안 전기영동을 행하였다.

(4) DNA의 절단과 DNA fragment의 회수

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, plasmid의 절단은 적당한 digestion buffer에서 37°C, 1시간동안 수행되었다. 제한 효소 처리에 의해 발생하는 DNA 절편은 TAE buffer를 사용한 0.7% agarose gel 전기영동을 행하여 분석하였다. 제한효소로 절단된 절편은 agarose gel상에서 전기영동한 후 원하는 DNA단편들을 GENE CLEAN II KIT로 정제하였으며, 여기에 사용된 모든 시약들을 GENE CLEAN II kit에 포함되어 있거나 제조회사의 지시대로 만들어 사용하였다.

2) *Aa* genomic DNA의 분리

세포의 genomic DNA분리는 Zambon 등²⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세균의 colony를 집균한 후 STE buffer 1ml에 현탁하고 2분동안 미세원심분리기(FISHER Scientific사, MODEL 235C, L.A., U.S.A.)에서 원심분리하여 상등액을 버리고 TE 475μl에 현탁한 후 lysozyme (10mg/ml) 25μl를 첨가하여 얼음속에 30분동안 방치하였다. 이 현탁액에 STEP buffer 90ml와 RNase(10mg/ml) 5ml를 첨가하여, 37°C에서 15분간 반응시킨후, proteinase K(20mg/ml) 5μl를 첨가하고 55°C에서 60분간 반응시켰다. 위 반응액과 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, pH 8.0)액 600μl를 넣어 잘 혼합하여 5분동안 미세원심분리기에서 원심분리하여 상등액을 취하고 동량의 chloroform-isoamyl alcohol 600μl를 첨가하여 혼합한 후 5분동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 3M sodium acetate 60μl와 isopropa-

nol 600μl를 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 후 10분동안 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 70% ethanol로 한번 세척한 후 상온에서 잔존하는 ethanol이 완전히 제거될 때까지 건조하여 TE 50μl에 DNA를 녹였다. 이 DNA용액을 spectrophotometer로 양을 측정한 후, -20°C에서 보관하여 다음 실험에서 사용하였다.

3) Southern Blotting와 hybridization

(1) 보합결합 표지자(Hybridization probe)의 준비

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, *Aa* 균주들의 genomic DNA상에서 균주간 DNA 유전자 지문양상을 위하여 사용된 보합결합 표지자는 plasmid pAA2097에서 제한효소 *EcoR* I 과 *Sal* I 으로 절단된 약 4.7kb DNA 절편을 agarose 전기영동상에서 분리하여 GENE CLEAN II kit로 회수하여 사용하였다.

(2) Enterobacteria genomic DNA의 transfer

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, DNA는 0.8% agarose gel로 3시간 동안 전기영동하였다. agarose gel에 분리된 DNA 절편을 변성시켜 Nylon filter(Bio-Rad사)에 흡착, 고정된 방법은 Maniatis 등⁴¹⁾의 방법을 변형하여 행하였다. capillary transfer법으로 filter에 DNA를 흡착시켰다. Gel은 500ml의 변성용액에 넣어 1시간 정도 실온에서 천천히 진탕한 후, 증류수로 2회정도 gel을 세척하여 500ml의 중화용액을 넣고 실온에서 30분정도 천천히 진탕하였다. Gel은 10X SSC가 담긴 그릇위의 3mm filter paper위에 거꾸로 놓은 후 미리 10X SSC에 포화된 Nylon filter를 gel위에 놓고 그 위에 3mm filter paper 두장과 paper towel(Kim towel type 50)을 15cm 정도 되게 하여 약 0.5-1Kg 정도의 무게를 올려 놓고 overnight시켰다. Nylon filter가 ge로 부터 분리되어 2X SSC에서 간단히 세척한 후 paper towel에서 습기를 제거하고 80°C의 진공 oven에서 2시간 동안 구워 고정하였다.

(3) Southern hybridization

김과 허^{32,33)}가 사용한 방법은 간략하게 설명하자면, genomic DNA에 대한 제한절편장다

III. 결 과

변화 분석을 위해 사용한 southern hybridization은 nonradioactive labelling system인 Enhanced Chemiluminescence(ECL) Kit (Amersham Co., U.S.A.)를 사용하였다.

표지자로 쓸 DNA를 증류수로 100ng/10 μ l 되게 희석하였다. 이 DNA 용액을 끓는 물에 5분간 담가둔 후 얼음속에서 5분동안 방치하고 5초간 원심분리하였다. DNA 용액과 동량의 DNA labeling agent를 첨가하여 잘 혼합한 후 동량의 glutaraldehyde solution를 가하여 1초간 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 즉시 사용하였다.

hybridization bag에 DNA blot된 Nylon filter를 넣고 filter의 면적(0.25ml/cm)에 따라 pre-hybridization 용액 양을 첨가한 후 42 $^{\circ}$ C의 waterbath에서 약하게 진탕하면서 1시간동안 prehybridization을 하였다. hybridization bag에 label된 표지자를 첨가하여 12-14시간동안 42 $^{\circ}$ C에서 진탕하면서 보합결합을 수행하였다. 반응이 끝난 filter를 깨끗한 용기에 옮겨 primary wash buffer(2ml/cm)로 20분간 2회 반복하여 세척하고, 상온에서 secondary wash buffer(2ml/cm)로 5분간 두번 세척하였다. 이 filter를 3mm paper 위에서 1분간 건조한후 filter면적(0.125ml/cm)에 따라 final volume이 맞게 동량의 detection 1과 2를 혼합하여 filter 위에 붓고 1분간 반응시켰다. 반응액을 제거한 다음 filter를 wrap으로싼 뒤, 암실에서 intensifying screen이 있는 cassette에서 hyper film-ECL(PRN2103)에 장착하여 1-15분 동안 방치한 후 현상하였다.

여기에서 사용한 반응 system 용액은 구입 회사의 지시에 따라 filter의 면적에 비례하여 사용하였다. 유전자형의 명칭은 표준 혈청형 a, b, c가 나타내는 지문 양상을 기준으로 하여 각각 A, B, C형으로 분류하고, 혈청형 d와 e가 나타내는 지문 양상을 역시 각각 D와 E라고 지칭하였다. 또한 A, B, C, D, E 어떤 형도 나타내지 않는 기타형을 보이는 유전자형을 NT로, 미결정 혈청형을 nd로 나타내었다.

1. Aa 표준균주 혈청형 a, b, c 및 혈청형 d, e의 유전자 지문형태

Dr.DiRienzo가 기증한 표지자로 사용된 4.7kb randomly cloned된 probe가 포함된 9.0 plasmid pAA2097의 제한 map은 그림 1과 같다.

통법대로 host E.coli DH5 α 에 도입해 DNA를 증폭한 다음 plasmid DNA의 분리 및 정제를 하고, DNA 제한효소 EcoR I 과 III로 제한 절편을 얻어 4.7kb probe를 최종 분리 정제하였다(그림 2).

Hybridization에 표지자로 사용된 4.7kb 유전자 절편에 의해 인지된 유전자 지문양태는 실험된 5가지의 혈청형 별로 서로 다르게 인지되어 나타났다. 표준균주 혈청형 a(ATCC 29523)는 제한절편의 각각 23.1Kb와 2.5Kb에서 각각 hybridization이 되었고, 혈청형 b의 경우 6.6Kb에서, 혈청형 c는 9.5Kb에서, 혈청형 d는 23.1Kb와 2.8Kb, 혈청형 e는 23.7Kb와 2.1Kb에서 각각 hybridization 되었다(그림 3).

유전자형의 명칭은 표준 혈청형 a, b, c가 나타내는 지문양상을 기준으로 하여 각각 A, B, C형으로 분류하고 혈청형 d, e가 나타내는 지문양상을 역시 D, E라고 지칭하였다.

2. 임상검출 균주의 혈청형과 유전자형의 분포양상

사용된 방법으로 판별된 임상 검출균주의 혈청형은 총 37개 균주에서 a형 3개, b형은 검출되지 않았으며, c형은 21개였고 a, b, c 어느 것에도 해당되지 않는 미결정형(not determinant : nd)은 총 13개에 해당하였다. 유전자형은 A형이 3개, C형이 14개, D형이 11개, E형이 1개, B형은 검출되지 않았고, 어느 유형에도 속하지 않는 기타형(NT : Non-Type)은 9개였다(표 2).

3. 혈청형 분포와 유전자형 분류의 상관관계

혈청형 a로 판별된 총 3개의 균주중 유전자형 A가 3개였고, 혈청형 c의 경우 유전자형 C가

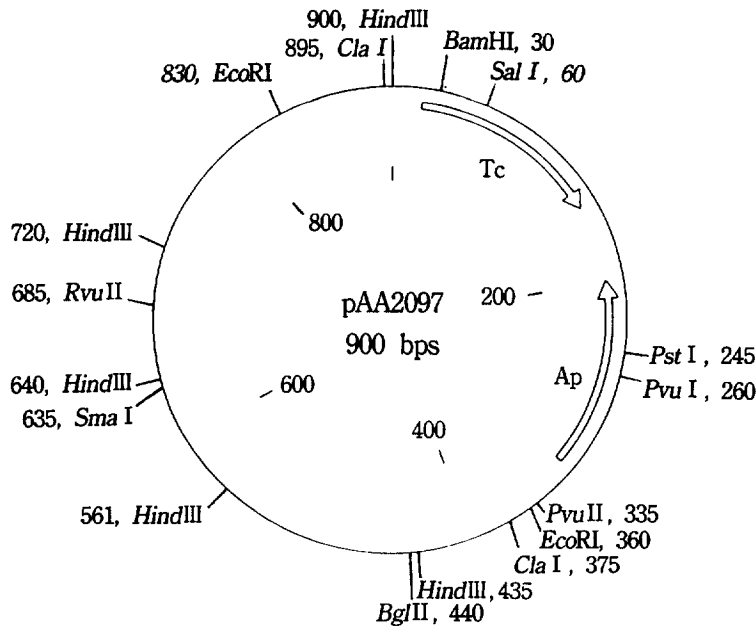


Fig. 1. DNA restriction map of plasmid pAA2097 containing 1.6kb-sized probe used in the present study.

Fig. 2. Restriction patterns plasmid pAA2097 using DNA endonuclease EcoRI+Sal I (Lane 3) and EcoRI+Hind III (Lane 4), respectively. Lane 1 : Lambda/Hind III marker, Lane 2 : uncut plasmid pAA 2097, Lane 5 : 1-Kb Ladder DNA size marker.

Fig. 3. DNA fingerprinting patterns of Aa serotype a, b, c(ATCC), d and e(Univ. of Helsinki, Finland), respectively. Lane 1 : genotype E(serotype e) Lane 2 : genotype D(serotype d) Lane 3 : genotype C(serotype c) Lane 4 : genotype B(serotype b) Lane 5 : genotype A(serotype a)

Table 2. Serotype and genotype distribution of 37 sampled clinical isolates from 8 family groups.

Serotype	Number of isolates(%)
a	3(8.108)
b	0(0.000)
c	21(56.757)
nd	13(35.135)
Genotype	Number of isolates(%)
A	3(8.11)
B	0(0.00)
C	13(25.14)
D	11(29.73)
E	1(2.70)
Non-Type	9(24.32)
Total number	37

Table 3. Genotype distributions of 37 clinical isolates according to serotypic classification.

Serotype	Number	Genotype	Number
a	3	A	3
b	0	B	0
c	21	C	13
		NT	7
		E	1
nd	13	D	11
		NT	2

(nd : not determined, NT : Non-Type)

Fig. 4. Genotypes of Family III

13개, E형이 1개, 유전자형 NT가 7개였고, 혈청형 nd(a, b, c형이 아닌 것)은 총 13개로써 유전자형 D가 11개 그리고 NT형이 2개로 나타났다(표 3).

4. 가족 상호간의 유전자형의 분포양상

성인형 치주염과 급속 진행성 치주염, 국소 유년성 치주염을 가지고 있는 8가족에서, 유전자형 A가 3개, C가 13개, E가 1개 검출되었으며, NT형도 7개로 총 37개의 유전자형이 검출되었는데, 유전자형 B형은 검출되지 않았

Table 4. Distribution of *Aa* serotypes and genotypes in examined families

Family No.	Patients No.	Diagnosis	Genotype	Serotype
I	#1(son)	Early Periodontitis	A	a
	#2(father)	Moderate Periodontitis	C	c
II	#3(elder sister)	LJP	A	a
	#4-1(sister)	Early Periodontitis	A	a
	#4-2		C	c
III	#5-1(son)	Early Periodontitis	C	c
	#5-2		C	c
	#5-3		NT	c
	#5-4		C	c
	#5-5		C	c
	#6-1(mother)	Moderate Periodontitis	C	c
	#6-2		C	c
IV	#7-1(brother)	RPP	NT	c
	#7-2		NT	c
	#8-1(elder brother)	RPP	NT	c
	#8-2		NT	c
	#8-3		E	c
V	#9-1(sister)	RPP	D	nd
	#9-2		D	nd
	#10-1(brother)	RPP	C	c
	#10-2		C	c
	#10-3		C	c
VI	#10-4		C	c
	#11-1(husband)	RPP	D	nd
	#11-2		D	nd
	#11-3		D	nd
	#12-1(wife)	Moderate Preiodontitis	D	nd
	#12-2		D	nd
VII	#12-3		D	nd
	#13-1(elder brother)	RPP	D	nd
	#13-2		D	nd
	#13-3		D	nd
VIII	#14(sister)	RPP	C	c
	#15-1(wife)	Moderate Periodontitis	NT	c
	#15-2		NT	c
	#16-1(husband)	Moderate Periodontitis	NT	nd
	#16-2		NT	nd

다. 그중에서, 동일한 가족내에서 서로 같은 유전자형을 보인 가족이 5가족이었는데, 유전자형 A가 같은 가족이 한 가족으로 자매간이 서로 같이 유전자형을 보였으며, 유전자형 C가 같은 가족이 한 가족으로 모자간에 나타났다. 그리고 유전자형 D가 같은 경우가 부부간에 나타났으며, NT형이 같은 경우도 2가족으로 형제간과 부부간에서 나타났다. 그리고 동일한 가족내에서 서로 다른 유전자형을 보인 경우가 3가족 있었는데 부자간인 경우가 1가족으로 유전자형 A와 C형으로 달랐으며, 2가족에서는 남매간의 경우로 유전자형 C형과 D형으로 나타났다(표 4, 그림 4-9).

IV. 총괄 및 고안

본 연구는 부산대학교 치과대학 치주과에서 연속적으로 시행한 치주세균 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 분자유전학적인 일련의 연구중 한 부분으로서 이 세균의 임상분리종을 중심으로 가족간의 세균전이양상을 규명함을 목적으로 시행되었다. 이 일련의 연구중 이미 완료된 내용들로는 표준혈청형과 임상검출균종의 혈청형과 유전자형의 상관관계를 파악하고³⁰⁾, 동시에 분리종과 치주질환의 심도와의 연관성을 혈청형 및 유전자형을 중심으로 파악하는 일이었다³²⁾.

본 연구 대상은 전체적으로 성인형 치주염 환자 8명(초기치주염 3명, 중등도 치주염 5명) 급속진행형 치주염환자 7명, 국소유년형 치주염환자 1명을 대상으로 하였는데, 초기치주염인 경우에는 C형이 가장 많이 나타났으며, 중등도 치주염인 경우는 C, D, NT형이 골고루 분포된 양상을 보였다. 국소 유년형치주염인 경우에는, 모두 유전자형 A형으로 나타났다. 급속진행형 치주염에는 D형이 분포가 제일 많았다. 이와 같은 결과는 Aa 혈청형 사이에 중요한 유전적인 차이가 있으며, 특정 Aa clones과 치주질환 사이의 연관을 제시한 Askainen등³⁷⁾의 연구를 뒷받침 한다. 혈청형인 경우를 보면 성인형 치주염인 경우, 검출된 총 18개 균주중 c형이 11개로 대다수를 차지했는데 이는 Tsai와 Tai-

chman²⁵⁾의 연구결과와 유사했다. 급속 진행형 치주염인 경우에는 검출된 균주가 c형, nd형으로 양분되어 나타났는데, 국소유년형 치주염, 급속진행형 치주염, 성인형 치주염 환자 모두 혈청형 b의 분포가 우세하다는 Ebersole²⁴⁾의 연구와는 다르게 나타났다. 그리고 혈청형이 부자간이 각각 a와 c, 모자간은 모두 c형으로, Aa의 가족내 전이에 관한 연구에서 자식은 항상 부모와 같은 혈청형을 가진다는 Alaluusua등³⁴⁾의 연구결과와는 달랐다.

가족내 전이양상을 살펴 보면 같은 진단명을 가진 경우가 4가족이 있었는데 중등도 치주염인 경우가 1가족, 급속진행형 치주염인 경우가 3가족으로 형제간 1가족, 남매간 2가족, 부부간 1가족이었다. 그중에서도 형제간인 경우에는 유전자형이 NT형으로 동일한 유전자형을 보였다. 중등도 치주염으로 진단된 가족은 부부간이었는데, 부부 모두 NT형으로 동일한 유전자형을 보였다. 즉, 참여한 가족 8가족중 동일한 진단명과 동일한 유전자형을 보이며, 가족내 전이를 보이는 경우가 형제간, 부부간 2가족으로 유전자형이 모두 NT형을 나타냈다. 이것은 Aa의 혈청형과 생물형(biotypes)의 결정에 근거하여 국소유년형 치주염의 구성원을 가진 가족내 전이를 제안한 Zambon등³⁸⁾의 연구와 심한 치주염을 가진 성인 치주염과 치주적으로 건강한 어린이가 있는 23가족을 대상으로 Aa의 발병율과 혈청형 분포에 근거해 가족내 전이를 제시한 Alaluusua등³⁴⁾의 연구를 뒷받침하며 균은 다르지만, 부부간의 *P.gingivalis*의 전이를 제시한 Van Steenberg등³⁵⁾의 연구와도 일치한다.

다섯가지 유전자형을 기초로하여 임상 검출 균주 총 37개에 대해 혈청형 분포와의 상호 연관성을 살펴 보았을 때, 혈청형 a는 유전자형 A와 혈청형 c는 유전자형 C에 상응하는 빈도가 높게 나타났는데, 혈청형 b와 유전자형 B는 검출되지 않았다. 이러한 결과는 검출균주에서 혈청형과 유전자형의 상호 연관성을 찾을 수 없었다는 DiRienzo와 Slots³⁶⁾의 연구결과와는 달랐다. 그리고, 미결정형을 혈청형 d, e와 분류되지 않는(untypable)형으로 보았을 때, 미

결정형 13개 균주중 유전자형 11개, 기타형 (NT형) 2개의 검출로 유전자형 D의 빈도가 상응하게 높게 나타난 것은 미결정형과 유전자형 D, E의 상호 연관성을 볼 수 있을 것이다.

가족상호간의 유전자형의 분포양상을 보면 동일한 가족내에서 서로 같은 유전자형을 보인 경우가 5가족 있었는데 A가 같은 가족이 한 가족으로 자매간이 서로 같은 유전자형을 보였고, 유전자형 C가 같은 경우가 한 가족으로 모자간에서 나타났다. 그리고 유전자형 D가 같은 경우가 부부간에서 나타났으며, NT형이 같은 경우도 2가족으로 형제간과 부부간에서 나타났다. 그리고 동일한 가족내에서 서로 다른 유전자형을 보인 경우가 3가족 있었는데, 부자간인 경우가 한가족으로 유전자형 A와 C형으로 달랐으며, 2가족에서는 남매간인 경우로 유전자형 C형과 D형으로 나타났다. 개체별 혈청형과 유전자형의 분포를 살펴 보았을 때, 혈청형인 경우 16명의 개체중 1명에서 혈청형 a와 c가 나타났다. 이러한 것은 동일개체내에서도 두가지 혈청형이 있다고 한 Chung등²⁷⁾과 Saalera등²²⁾의 연구를 뒷받침해 준다. 그리고 본 연구에 참여한 16명중에서 같은 사람에게서 서로 다른 유전자형을 갖는 경우도 3명 있었는데, 유전자형이 각각 A와 C, NT와 C, E와 NT형으로 나타났다. 이러한 결과는, 혈청형을 밝히지는 않았으나 연구대상 12명중 3명에서 동일개체내 두가지유전자형을 보고한 DiRienzo와 Slots³⁶⁾의 연구와 상응한다. 그러나, Saalera등²²⁾은 동일 개체내 두가지 유전자형이 발견되었을 때, 이들이 항상 서로 다른 혈청형을 보인다고 하였으나, 본 연구에서는 혈청형 c를 가지는 두명의 개체에서 C와 NT형, E와 NT형의 지문형태가 인지되었다. 이것은 또한 혈청형보다 유전자형이 더 다양할 수 있다고 생각할 수 있다.

만약, Aa가 외인성 치주병인균으로써 간주 되어진다면, 감염의 시기와 경로에 대한 지식은 감염의 조절을 위해 중요하다. 전이경로를 보면 Genco등³⁰⁾은 직접 접촉이나 공동으로 사용하는 치솔같은 물건이나 agent를 가지고 있는 타액이나 다른 액체의 작은 물방울 등에 의한 간접

접촉을 통해서 일어날 수 있다고 했으며, Alaluusua등³⁴⁾은 사람이 Aa를 가지고 있다면 타액이 전이에 있어서 직접 또는 간접 매개체로서 작용할 수 있다고 하였다. 따라서, 본 연구에서의 모자간, 형제간, 자매간, 부부간의 동일한 유전자형의 발견은 숙주의 치주세균 획득요인중의 환경요소의 하나로 제시할 수 있을 것이다.

DNA 제한 효소 분석은 검사자의 판독 능력에 의존하지만 역학 조사에 유용하게 이용할 수 있으며, 더 나아가 DNA probe를 이용한 hybridization 방법은 구별하기 어려운 DNA fingerprint를 구분하는데 도움이 될 수 있다. 따라서, 본 연구는 DiRienzo와 Slots³⁶⁾의 방법과 같은 DNA hybridization 법으로 얻은, 혈청형에 따라 상이한 유전자지문형태를 분류해서 Aa의 가족내 전이를 살펴 보았으며, 만약 Aa가 숙주의 치주 세균 획득 요인중의 환경 요인에 의한 것이라면, Aa의 감염을 방지하기 위해서 Aa 감염에 대한 출처와 전이경로뿐만아니라 감염 시기를 규명하기 위한 보다 광범위한 역학조사와 필요성이 사료된다.

V. 결 론

한국인에 있어서 Aa의 가족내 전이양상에 대해서 고찰한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 임상분리균주 총 37개는 6종의 유전자형 제한절편장다변화(RFLP)양상을 보였고 8 가족중에서 5가족에서 부부간, 모자간, 형제간, 자매간등의 다양한 전이양상을 나타내었다.
2. 전이를 보이는 세균은 특이한 유전자형에 국한되지 않았고, 개체당 2종이상의 유전자형이 출현하는 경우도 있었다.
3. 치주세균 Aa는 가족간의 높은 전이양상을 나타냄이 입증되었고, 이는 숙주의 치주세균 획득요인중의 환경요소의 하나로 제시할 수 있었다.

참고문헌

1. Socransky, S.S. : Relationship of bacteria to etiology of periodontal disease. J. Dent. Res., 49 : 203, 1970.
2. Socransky, S.S. : Microbiology of periodontal disease : Present status and future consideration. J. Periodontol., 48 : 497, 1977.
3. Slots, J. and Genco, R.J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytopaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : Virulence factor in colonization, survival and tissue destruction. J. Dent. Res., 63 : 411, 1984.
4. Zambon, J.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 12 : 1-20, 1985.
5. Zambon, J.J., Slots J. and Genco, R.J. : Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. Infect. Immun., 41 : 19-27, 1933.
6. Mandell, R.L. : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. Infect. Immun., 45 : 778-780, 1984.
7. Genco, R.J., Zambon, J.J., and Christersson, L.A. : The role of specific bacteria in periodontal disease : The origin of periodontal infection. Adv. Dent. Res., 2 : 245-259, 1988.
8. Kornman, K.S. and Robertson, P.B. : Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. J. Periodontol., 56 : 443-446, 1985.
9. Mandell, R.L., Ebersole, J.L. and Socransky, S.S. : Clinical immunologic and microbiologic features of active disease sites in juvenile periodontitis. J. Clin. Periodontol., 14 : 534-540, 1987.
10. Slots, J., Reynolds, H.S. and Genco, R.J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. Infect. Immun., 29 : 1013-1020, 1980.
11. Bragd, L., Dahlen, G., Wikstrom, M. and Slots, J. : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedia* to indicate progressive periodontitis : A retrospective study. J. Clin. Periodontol., 14 : 95-99, 1987.
12. Slots, J. and Listgarten, M.A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., 15 : 85-93, 1988.
13. Slots J. : Bacterial specific in adult periodontitis : a summary of recent work. J. Clin. Periodontol., 13 : 912-920, 1988.
14. Ebersole, J.L., Cappelli, D. and Sandovla, M.N. : Subgingival distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis. J. Clin. Periodontol., 21 : 65-75, 1994.
15. Asikainen S, Alaluusua S, Kari K, Klemola-Kujala E. : Subgingival microflora and periodontal condition in healthy teenagers. J. Periodontol., 57 : 505-509, 1986.
16. Alaluusua S, Asikainen S. : Detection and distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the primary dentition. J. Periodontol., 59 : 504-507, 1988.
17. Kilian M, Schiott CR. : Haemophil and related bacteria in the human oral cavity. Arch Oral Biol., 20 : 791-796, 1975.
18. Genco R.J. Zambon J.J., Christersson L.A. : use of interpretation of microbiological assays in periodontal disease. Oral Microbiol Immunol., 1 : 73-79, 1986.
19. Kornmann K. : Age, supragingival plaque,

- and steroid hormones as ecological determinants of the subgingival flora. In : Genco R, Mergenhagen S, eds Host-Parasite interactions in periodontal Disease. Washington DC : American Society of Microbiology, 132-138, 1982.
20. Genco R.J., Zambon J.J. Christersson L.A. : The origin of periodontal infections. *Adv Dent Res.*, 2 : 245-259, 1988.
 21. Preus H.R., Olsen I. : Possible transmittance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from a dog to a child with rapidly destructive periodontitis. *J. Periodont Res.*, 23 : 68-71, 1988.
 22. Saarela, M. Asikainen, S., Alaluusua, S., pyhala, L., Lai, C.H. and Jousimies-Somers, H. : Frequency and stability of mono or polyinfection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7 : 277-279, 1992.
 23. Asikainen, S., Lai, C.H. and Alaluusua, S. : Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiol. Immunol.*, 6 : 115, 1991.
 24. Ebersole, J.L. and Sandoval, S. : Serum antibody in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-infected patients with periodontal disease. *Infect. Immun.*, 59 : 1795, 1991.
 25. Tsai, C.C. and Taichman, N.S. : Dynamics of infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis. *J. clin. Periodontol.*, 13 : 330-331, 1986.
 26. Song, E-J., Chung, C-P. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* SNUDC strains isolated from LJP. *J. Korean Acad. Periodontol.*, 14 : 87, 1984.
 27. Chung, H-J., Chung, C-P. and Son, S-H. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean LJP. *J. Periodontol.*, 60 : 506, 1989.
 28. Genco, R.J. and Loos, B.G. The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 18 : 396-405, 1991.
 29. Zambon, J.J. Sunday, G.J. and Smutko, J.S. : Molecular genetic analysis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* epidemiology. *J. Periodontol.*, 61 : 75-80, 1990.
 30. Direnzo, J.M., Cornell, S., Kzaoroski, L. and Slots, J. : Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 5 : 49-56, 1990.
 31. Saarela, M., Asikainen, S., Jousimies-Somers, H., Asikainen, T., von Troil-Linden, B. and Alaluusua, S. : Hybridization patterns of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a-e detected with an rRNA gene probe. *Oral Microbiol. Immunol.*, 8 : 111-115, 1993.
 32. 김은경 · 김성조 · 최점일 : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 혈청형과 유전자형 분포가 치주질환 심도에 미치는 영향, 대한치주과학회지 24 : 541-560, 1994.
 33. 허경기 · 김성조 · 최점일 : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 임상분리 혈청형에 따른 유전자 지문양상에 관한 연구, 대한치주과학회지 25 : 153-166, 1994.
 34. Alaluusua, S., Asikainen, S., Lai C-H. : Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.*, 62 : 207-210, 1991.
 35. Van Steenberg, T. J. M., Petit, M. D. A., Scholte, L. H. M., Van der Velden, De Graaff, J. : Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. *J. Clin. Periodontol.*, 20 : 340-345, 1993.
 36. DiRienzo, J. M., Slots, J. : Genetic approach to the study of epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomyce-*

- temcomitans* in localized juvenile periodontitis. Arch Oral Biol., 35 : 79S–84S, 1990.
37. Asikainen, S., Chen C, Slots J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and Periodontal status. Oral Microbiol. Immunol., 10 : 65–68, 1995.
38. Zambon, J.J., Christersson, L.A. and Slots, J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease ; prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. J. Periodontol., 54 : 707–711, 1983.
39. Syed, S.A. and Loesche, W.J. : Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl. Microbiol., 24 : 638–644, 1972.
40. Slots, S. : Selective medium for the isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* J. Clin. Microbiol., 15 : 606–609, 1982.
41. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning. Cold Spring Harbor. New York (1989).

INTRAFAMILIAL TRANSMISSION OF *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS* IN KOREAN POPULATIONS

Young-In Jeong, Sung-Jo Kim, Jeom-Il Choi

Department of Periodontology, College of Dentistry, Pusan National University

The present study has been performed to see the intrafamilial transmission of periodontopathic organism *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Koreans having various forms of periodontal diseases. 17 clinical isolates from 8 periodontal patients and 20 clinical isolates from their 8 family members were grown anaerobically for the serotyping and the extraction of genomic DNA. The DNA was digested with restriction endonucleases (*EcoRI*+*HindIII*) and plasmid pAA 2097 (kindly provided by Dr. Di Rienzo, Univ. of Pennsylvania) including 4.7kb-size randomly clone probe for restriction length polymorphism analysis (RFLP). RFLP patterns of reference serotypes a, b, c, d, and e were used as the genotypes A, B, C, D, and E, respectively for comparison of genotypes of clinical isolates.

28 out of total 37 clinical isolates belonged to either one of 5 basic genotypes and 9 remaining isolates did not fall into any types, and hence were designated as non-type (NT). Genotype C were the most frequently found one (35.1%) and genotype B has not isolated. Intrafamilial transmission of bacteria between spouses, brothers and sisters, and parents and their offsprings, respectively could well be demonstrated by comparing RFLP patterns. There were not any specific genotypes which showed predominance over others in terms of transmission.

Key words : Intrafamilial transmission, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, restriction length polymorphism, Genotyping.