

치주질환이 없는 청년의 치은연상 및 치은연하 치면세균막에 존재하는 치주질환 관련 4종 세균의 분포 비교

장현선^{1,4} · 김지연¹ · 국중기^{2,4} · 유소영² · 김화숙² · 김수관^{3,4} · 김병욱^{1,4,*}

조선대학교 치과대학 치주과학교실¹, 구강생화학교실², 구강악안면외과학교실³, 구강생물학연구소⁴

I. 서론

치주질환은 치주조직의 염증과 구조의 소실을 야기시키는 질환으로 다양한 전신적 및 국소적 요인들에 의하여 발병되며, 여러 발병 요인 중 치주질환과 가장 밀접한 관계가 있는 요인은 치면세균막으로 알려져 있다¹⁾. Paster등²⁾은 치면세균막 내에 약 400여 세균 종들이 존재한다고 보고하였고, 현재 전 세계적으로 특정 치주질환과 관련된 구강 내 병원성 세균간의 역학관계 및 치주질환 병소에 호발하는 세균의 분포 양상에 관한 연구들이 활발히 이루어지고 있다^{3,4,5,6,7,8)}. 치주질환 중 가장 흔한 성인형 치주염은 치은연하 치면세균막 내의 *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 및 *Bacteroides forsythus*등과의 깊은 관련성이 보고되었다⁹⁾. 치주질환은 정도에 따라 병원성 세균의 분포양상에 차이를 보이며, 건강한사람간에서도 유의성있는 차이가 발견될 수 있으며, 치주질환 관련 병원성 세균들 대부분이 산소에 민감한 혐기성 세균들이기 때문에 치주질환 관련 병원성 세균의 검출시,

치은연상 치면세균막에 비해 산소의 공급이 원활하지 않기 때문에 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 조건을 갖추고 있는 치은연하 치면세균막이 우선적으로 이용되고 있다¹⁰⁾. 그러나 최근에는 치은연상 치면세균막도 치은연하 치면세균막과 서로 연결되어 있고, 장기간 침착되어 치면세균막이 두꺼워지면 공기의 유입이 차단되어 치은연상 치면세균막의 깊은 부위에서는 산소의 유입이 차단되므로 혐기성 세균이 존재할 가능성이 보고되면서 치주질환 관련 세균들의 치은연상에서의 연구가 주목되고 있다^{10,11)}. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*는 치주질환의 3대 대표적인 병원균으로 널리 알려져 있고, 치은염과 치은염에서 파괴적인 치주염으로의 전이기에 관여하는 *F. nucleatum*은 치은염구에서 주로 발견되며 다른 주요 세균과의 공동 응집에 중심적 역할을 하는 것으로 보고되었다^{12,13)}. 특히 통성 그람 음성 간균인 *A. actinomycetemcomitans*는 국소유년형 치주염과 난치성 치주질환뿐 아니라 질병이 없는 부위에서도 발견될 수 있다고 보고됨으로서 치주병소가 없는 건강한 사람의 치은연하뿐만 아니라 치은연상 치면세균막에서의 그 존재 가능성을 시사해준다고 볼 수 있다.

*이 논문은 2001년도 조선대학교 학술연구비를 지원받아 연구되었음.

교신저자: 김병욱, 광주광역시 동구 서석동 375번지, 조선대학교 치과대학 치주과학교실, 우편번호: 501-759,

전화번호 : (062) 220-3850, 팩스번호 : (062) 224-4664, E-mail : bobkim@mail.chosun.ac.kr

그러므로, 본 연구에서는 치주질환을 가지고 있지 않는 청년을 대상으로 치은 연상 및 치은 연하 치면 세균막에 존재하는 치주질환 관련 병원성 세균 중 치주질환과 밀접한 상관관계가 있다고 보고 한 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* 와 중증도의 상관관계가 있다고 보고 한 *F. nucleatum* 등 4종 병원성 세균의 존재 유무를 중합효소연쇄 반응법을 이용하여 알아보고, 이를 바탕으로 치주질환에 이환된 확률이 높은 군과 낮은 군을 예측할 수 있는 모델을 정립하는 데 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

조선대학교 치과대학에 재학 중인 학생들 중 최근 6개월 이내에 항생제를 복용한 경험이 없으며 치주 치료를 받지 않았고, 치주질환이 없는 남녀 20명을 조사 대상으로 하였다(Table 1). 조사 대상자의 연령은 22세 이상 28세 미만이었으며, 평균 연령은 23.65세였다. 대상 치아의 치주낭 깊이는 3 mm 이내로, William씨 치주낭 측정기를 이용하여 조직의 저항이 느껴질 때까지 치은변연에서 치주낭 최심부까지의

Table 1. Clinical characteristics of periodontally healthy subjects

	Subjects
Total number	20
female	7
male	13
Age(years)	
mean	23.65
range	22-28
Probing depth(mm)	
mean	1.2
range	1-3
Gingival index	0
Plaque index	
mean	1.5
range	0-2
Gingival bleeding index	0

거리를 측정하고 가장 가까운 눈금을 읽어 탐침시 치주낭 깊이로 기록하였다. 또한 Löe & Silliness(13) 치은지수(Gingival Index; GI)가 "0" 이고, 치면세균막지수(19)(Plaque index; PI)가 0-2, Ainamo와 Bay(1)의 치은 출혈지수(Gingival bleeding index; GBI) 측정 방법에 의해 출혈이 없는 경우만을 선별하였다.

조사 대상자의 상하악 제1대구치와 중절치 치아에서 각각 치은연상 치면세균막과 치은연하 치면세균막을 채취하여 총 160개의 표본을 대상으로 하였다.

2. 연구 방법

1) 치면세균막 채취 및 DNA 추출

면구와 압축공기를 이용하여 치아주위를 방습하고, 멸균된 치주과용 큐렛으로 치은연상 치면세균막을 채취하여 500 ml의 1X PBS 용액에 담았다. 남아 있는 치은연상 치면세균막을 제거한 후에 같은 부위에서 다른 멸균된 치주과용 큐렛으로 치은연하 치면세균막을 채취하여 또 다른 500 ml의 1X PBS 용액에 담았다. Komiya등¹⁴⁾의 Direct DNA extraction method를 이용하여, 채취한 표본을 2X LSE buffer(2 mM EDTA, 1% Triton X-100) 용액 100ml에 넣고 95℃ 이상에서 15분간 가열하여 세균 DNA를 추출하였다.

2) 중합효소연쇄반응

일차적으로 16S rRNA를 증폭하기 위하여 AccuPower[®] Premix (Bioneer Corp., Seoul, Korea), 20 pmoles의 primers, 100 pg의 세균 genomic DNA와 멸균 증류수로 20 μl의 PCR 혼합용액을 만들었다. PCR primer는 Uni-F(AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 Uni-R(GGT TAC CTT GTT ACG ACT T), PCR machine으로는 PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA, U.S.A)이 사용되었다.

PCR의 반응조건은 다음과 같다. 95℃에서 1분간 denaturaion, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension하는 과정을 30회 반복하였고, 95℃에서 2분간 predenaturation, 72℃에서 10분간 pos-

Table 2. PCR primers *Porphyromonas. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Fusobacterium nucleatum*

Target species	Species-specific primers (5' → 3')	Sizes(bp)
<i>Porphyromonas. gingivalis</i>	TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC ACGTCATCCCCACCTTCCTC	197
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CACTTAAAGGTCCGCCTACGTGCC	593
<i>Bacteroides forsythus</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA TGCTTCAGTGTTCAGTTATACCT	641
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	CGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT TTGCTTGGGCGCTGAGGTTTC	495

Table 3. Frequency of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, and *F. nucleatum* according to plaque location, teeth and gender

		No. of sample	Aa ¹	Pg ²	Bf ³	Fn ⁴
Teeth	Molar	Supra ⁺ (40)	6(15.0%)	7(17.5%)	24(60.0%)	31(77.5%)
		Sub ⁺ (40)	8(20.0%)	3(7.5%)	16(40.0%)	28(70.0%)
		Total(80)	14(17.5%)	10(12.5%)	40(50.0%)	59(73.8%)
	Incisor	Supra(40)	7(17.5%)	4(10.0%)	21(52.5%)	35(87.5%)
		Sub(40)	6(15.0%)	9(22.5%)	23(57.5%)	35(87.5%)
		Total80	13(16.3%)	13(16.3%)	44(55.0%)	70(87.5%)*
Gender	Female	Supra (28)	1(3.6%)	7(25.0%)	11(39.2%)	20(71.4%)
		Sub(28)	2(7.1%)	7(25.0%)	9(32.1%)	17(60.7%)
		Total56	3(5.4%)	14(25.0%)**	20(35.7%)	37(66.1%)
	Male	Supra(52)	12(23.1%)	4(7.7%)	34(65.4%)	46(88.5%)
		Sub(52)	12(23.1%)	5(9.6%)	30(57.7%)	46(88.5%)
		Total104	24(23.1%)**	9(8.7%)	64(61.5%)**	92(88.5%)**
Location	Supra	80	13(16.3%)	11(13.8%)	45(56.3%)	66(82.5%)
	Sub	80	14(17.5%)	12(15.0%)	39(48.8%)	63(78.8%)
Total	1	160	27(16.9%)	23(14.4%)	84(52.5%)	129(80.6%)

significantly different at *p<0.05, **p<0.01: Chi-Square tests

Aa¹: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Pg²: *Porphyromonas gingivalis*, Bf³: *Bacteroides forsythus*,

Fn⁴: *Fusobacterium nucleatum*, Supra⁺: Supragingival plaque, Sub⁺: Subgingival plaque

textension을 실시하였다.

PCR 산물을 1/100로 희석한 다음 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* 및 *F. nucleatum* 등 4종의 세균에 대해 기존에 알려진 16S ribosomal RNA 중 특이 PCR 프라이머(Table 1)를 이

용하여 치면세균막 내에 각각의 세균의 존재 유무를 알아보기 위해 nested PCR을 실시하였다⁵⁾.

Nested PCR의 반응조건은 다음과 같다. *A. actinomycetemcomitans*를 확인하기 위해 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1

분간 extension의 과정을 36회 반복시행하였고, *P. gingivalis*와 *B. forsythus*를 확인하기 위해 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 36회 반복시행하였다. 또한 *F. nucleatum*을 확인하기 위해 94°C에서 1분간 denaturation, 65°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension의 과정을 36회 반복시행하였다. 위의 4종류 세균의 nested PCR에서 95°C에서 2분간 predenaturation, 72°C에서 10분간 postextension을 시행하였다.

Nested PCR 산물을 ethidium bromide가 첨가된 1.5% 아가로스 젤에서 100 V로 25분간 전기영동을 시행하고 UV transilluminator를 이용하여 각각의 band 위치를 확인하였다.

3) 통계학적 분석

치아부위와 성별에 따른 치은연상 또는 치은연하 치면세균막의 세균 분포를 Chi-Square tests를 시행하여 분석하였다.

III. 결과

총 160개의 표본 중 *A. actinomycetemcomitans*는 27개(16.9%), *P. gingivalis*는 23개(14.4%), *B. forsythus*는 84개(52.5%), *F. nucleatum*은 129개(80.6%) 표본에서 관찰되었다.

치아 위치에 따른 치면세균막의 세균 분포에서 4종 모두 치은연상과 치은연하 간의 유의성은 없었다.

치아 부위에 따른 치면세균막 간의 세균 분포를 보면, 전치부와 구치부 모두 치은연상과 치은연하의 차이는 없었으나, 전체적인 분포에 있어서 *F. nucleatum*이 전치부에서 더 유의성 있게 높게 나타났고($p < 0.05$), 다른 3종에서는 유의성 있는 차이가 없었다.

성별에 따른 치면세균막 간의 세균 분포를 보면, 남녀 모두 치은연상과 치은연하의 차이는 없었으나, 전체적인 분포에 있어서 *P. gingivalis*는 여자에서 더 높게 나타났고, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*은 남자에서 더 높게 나타났다($p < 0.01$)(Table 3).

IV. 고찰

치주질환의 주 병원균으로 알려진 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum* 등은 건강한 치주조직에서도 상당한 비율로 발견된다^{7,16,17,18}. Ximenez-Fyvie 등¹⁹은 *F. nucleatum*은 구강 내 상주균 중의 하나로 특히 치은염증이 있을 때 더 많이 나타나고, *B. forsythus*와 *P. gingivalis*는 치주질환자에 비해 건강한 사람의 치은연상과 치은연하에서 더 적은 수가 검출되는데, 이것은 병원성 세균이 치주질환이 시작하기 전 상당 기간 동안 건강한 사람의 치은연상 치면세균막에 집락화되고 치은염증이 진행됨에 따라 그 숫자가 증가함을 시사한다고 하였다.

치주질환의 종류와 세균간의 역학 연구에 있어서 먼저 세균의 검출법 및 동정법이 확립되어야 하는데, 현재까지 개발된 세균 동정(identification)법으로는 세균배양법, ribotyping법, DNA-DNA hybridization, DNA fingerprinting, DNA probes, 16S 또는 23S 라이보솜 RNA(rRNA) 유전자 염기서열 결정법, 중합효소연쇄반응법 등이 이용되고 있다^{4,20}. 이러한 방법들 중 세균 종의 동정에 있어서 가장 신뢰할 만한 방법이 16S 또는 23S rDNA 염기서열을 이용한 종특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법이나 16S 또는 23S rDNA 핵산염기서열 결정법이다²⁰. 이러한 방법 중 가장 정확한 방법은 핵산염기서열 결정법이지만, 많은 시간과 경비 및 노동력이 필요하다는 단점이 있기 때문에 종특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법이 많이 사용된다²¹.

Ali 등¹⁶은 DNA-DNA hybridization법을 이용하여 건강한 사람에서의 치주병균을 연구하였는데, *A. actinomycetemcomitans* 9.5%, *P. gingivalis* 19.0%, *B. forsythus* 23.8%, *F. nucleatum* 42.8%의 발견율을 보고하였다. Gmür 등¹⁷은 monoclonal antibody를 이용하여 건강한 사람의 치주조직에서 *A. actinomycetemcomitans* 33%, *F. nucleatum* 48%의 발견 빈도를 보고하였고, Sirinian 등⁷은 PCR법을 이용하여 건강한 치주조직에서 *A. actinomycetemcomitans* 15%, *P. gingivalis* 15.0%, *B. forsythus* 14.0%의 발견

을 보고하였다.

본 연구는 치주치료를 받은 경험이 없는 건강한 남녀 20명의 상악하 제1대구치와 중절치에서 각각 치은연상 치면세균막과 치은연하 치면세균막을 채취하여 총 160개의 표본을 대상으로 치주질환의 대표적인 병원균인 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*의 정상 치주조직에서의 발현을 연구하고자 동시다발적으로 검출할 수 있는 nested PCR 방법을 이용하였다.

*A. actinomycetemcomitans*는 통성 그람음성 간균으로 숙주조직을 직접 침투하며 Lipopolysaccharide와 leukotoxin등을 생성하여 숙주의 방어기전을 파괴하고 유전형 치주염과 급성 파괴성 치주질환에 관여하며, *P. gingivalis*는 혐기성 그람음성 간균으로 숙주 조직과 세포에 부착 및 침투하고 Ig A 및 Ig G 분해효소를 생성하여 숙주방어 기전을 방해하며, trypsin-like enzyme과 교원질 및 fibronectin 분해효소를 생성하여 숙주조직을 분해한다고 하였다²¹. 또한 *B. forsythus*는 fusiform 형태의 혐기성 그람 음성 간균으로 neuraminidase등을 생성하여 숙주조직을 분해하고, 진행성 부착소실을 야기시키며, *F. nucleatum*은 혐기성 그람 음성 간균으로, 치은염과 치은염에서 파괴적인 치주염으로의 전이, 그리고 성인형 치주염에서 핵심적인 병원균의 하나로 치은열구에서 주로 발견되며, 다른 주요 세균과의 공동응집에 중심적 역할을 하는데, 특히 *P. gingivalis*와 함께 독성의 상승작용을 일으킨다고 보고되었다²².

치주 병원균을 검사하는 방법인 Culture method, DNA-DNA hybridization, Monoclonal antibodies, Polymerase chain reaction 등은 치주질환의 원인 규명과 치료에 많은 발전을 가져왔지만, 치주 질환이 어느 한가지의 요인보다는 복합적 요인, 즉 다양한 세균들에 의해 발생한다는 점을 고려할 때 치주질환의 조기 진단과 치료를 위해 다양한 치주 병원성 세균들을 단시간에 다발적으로 검사하는 방법이 필요하게 되었다. 세균의 검출을 위해서 본 연구에서 이용한 nested PCR 방법은 세균의 지놈 DNA를 이용한 Hybridization법과 세균의 세포막 항원에 대한 특이 항원을 이용하는 방법에 비해, 신속하고 정확하며 경

제적인 것으로 평가되고 있으며, 장시간이 소요되는 기존의 세균 검출 방법들에 비해 단시간에 다양한 세균들을 동시다발적으로 검출할 수 장점을 가지고 있다²³.

본 연구에서는 nested PCR법을 이용하여 치주적으로 건강한 청년에서 치주질환과 관련된 병원성 세균 중 *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum*등 4종에 대한 치은연상과 치은연하 치면세균막에서의 분포를 동시다발적으로 분석하였고, 치아부위와 성별에 따른 차이를 분석하였다. 본 연구에서 *A. actinomycetemcomitans* 16.9%, *P. gingivalis* 14.4%, *B. forsythus* 52.5%, *F. nucleatum* 80.6%로 관찰되었다(Table 4).

Ximenez-Fyvie등¹⁹은 건강한 치주조직을 가진 사람에서 치은연상과 치은연하 치면세균막 조성의 차이에 있어서 *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *F. nucleatum* 등은 치은연하에서 더 높은 분포를 보인다고 보고하였고, 성별에 따른 분포에서는 *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *T. denticola* 등의 분포에 차이가 없었다고 보고하였다. Schenkeine 등²⁴은 다양한 인종에서의 치은연하 세균 분포에 관한 연구에서 남녀의 차이는 없었다고 보고하였고, Sirinian등⁷은 *P. gingivalis*는 여자에서, *T. denticola*는 남자에서 더 높은 분포를 보인다고 보고하였다.

반면에 본 연구에서는 4종의 치주병원균 모두 치은연상과 치은연하의 분포에서 통계학적으로 유의성 있는 차이는 없었으나, *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*가 치은연하에서 더 높은 분포를 나타내었다. 본 연구의 성별에 따른 분포를 살펴보면 *P. gingivalis*는 여성에서 더 높은 분포를 보였고, 나머지 3종의 치주 병원균은 남자에서 더 높은 분포를 보였다.

건강한 치주조직에서의 세균 분포가 각 연구자들에 다르게 나타나는 이유는, 치면세균막 채취 방법과 세균 검출 방법의 차이, 식습관과 인종간의 차이를 고려할 수 있다^{25,26}. 본 연구에서는 치면세균막 채취를 위해 큐렛을 이용하였기 때문에 기존에 사용되었던 paper point보다 더 많은 양이 채취되어 검출된 세균의 양도 많았을 것으로 사료되며, nested PCR

의 경우 primer의 민감성을 항상 고려해야 한다는 어려운 점이 있지만, 본 연구에 사용된 여러 시약 중 EDTA와 Triton X-100은 중합효소연쇄반응에 사용되는 Taq DNA polymerase의 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 검증되었다²⁷⁾.

저자들은 본 연구를 통해 치주질환과 관련된 혐기성 세균을 치은연하뿐만 아니라 치은연상 치면세균막에서도 검출함으로써 치주질환이 없는 한국인의 치면세균막 내 치주질환 관련 세균의 분포양상에 대한 기초 자료를 얻었으며, 치은연상 치면세균막의 세균 동정을 통해 치주질환의 초기 진단 및 예후 평가에 활용할 수 있고 치은연상 치면세균막을 제거함으로써 치주질환의 초기 치료 및 예방에 기여할 것으로 사료된다. 또한 조사에 응하였던 학생들을 꾸준히 연차적으로 추적하여 초기 치주질환 병소가 생겼을 때 정상일 때와 비교 분석하면 초기 치주질환에 깊이 관여하는 세균을 동정할 수 있을 것으로 생각되며, 중합효소연쇄반응에 사용한 프라이머의 특이성에 따른 문제점을 고려하여 앞으로 더 많은 사람을 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. Moore WEC. Microbiology of periodontal disease. J. Periodont. Res 1987;22:335-341.
2. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J. Bacteriology 2001;12:3770-3783.
3. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. Int. Dent. J1975;25:229.
4. Conrads GR, Mutters J, Fischer. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally health individuals. J Periodontol 1996;67:994-1003.
5. Dahlen G, Manji F, Baelum V. Black-pigmented Bacteroides species and *Actinobacillus actinomycescomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. J. Clin. Periodontol 1989;16: 305-310.
6. Silness P, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. Acta. Odontol. Scand 1964;22:121.
7. Sirinian G, Shimizu T, Sugar C, Slots J, Chen C. Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in los angeles. J. Periodontol 2002;73:283-288.
8. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal disease. A critical assessment. J. Periodont. Res 1991; 26:195.
9. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. J. Periodontol 1992;63:322.
10. Kook J,K, Kim MK, Seong JH., Kim DK, Kim BO, Park JC, Kim KK, Choe SJ, Min BM. A new method for rapid screening of bacterial species- or subspecies-specific DNA probes. FEMS Microbiol. Let 2003;219:121-127.
11. Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, Woese CR. The ribosomal database project(RDP). Nucleic Acids Res 1996;24(1):82-85.
12. Brook I, Walker. The relationship between *Fusobacterium nucleatum* species and other flora in mixed infection. J. Med. Microbiol 1986;21:93-100.
13. Albandar JM, Brown LJ, Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. J. Periodontol, 1997;68:973-981.
14. Komiya A, Kato T, Nakagawa A, Saito J, Takahashi S, Yamada K, Okuda, A rapid DNA probe method for detection of Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycescomitans. J. Periodontol 2000;71:760-767.
15. Ashimoto AC, Chen I, Bakker, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 puta-

- tive periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral, Microbiol, Immunol* 1996;11:266-273.
16. Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J. Clin, Periodontol* 1997;24:830-835.
 17. Gmür R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque-A natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus* and *Prevotella nigrescens*. *J. Dental, Research* 1994;73:1421-1428.
 18. Tanner AR, Kent R, Maiden MFJ. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis, and putative active periodontal subjects. *J. Periodont, Res* 1996;31:195-204.
 19. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin, Periodontol* 2000;27:648-657.
 20. Savitt ED, Keville MW, Peros WJ. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. *Arch. Oral, Bio* 1990;35:153-159.
 21. Watanabe K, Frommel TO. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J. Clin, Periodontol* 1996;23:212-219.
 22. Norman PW, Robert RW, Samuel R. *Essential Dental Microbiology* 1991;319-339.
 23. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin, Periodontol* 1998;25:134-144.
 24. Schenkein HA, Burmeister JA, Koertge TE. The influence of race and gender on periodontal microflora. *J. Periodontol* 1993;64:292-296.
 25. Umeda M, Chen C, Bakker I. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J. Periodontol* 1998;69:1111-1118.
 26. Anerud KE, Robertson PB, Loe H, Anerud A, Boysen H, Patters MR. Periodontal disease in three young adult populations. *J Periodontal Res* 1983;18:655-668.
 27. Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B. Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *BioTechnique* 1990;9:308-309.

Comparison of the prevalence of 4 periodontopathogens in supra- and subgingival plaque of young adults without periodontitis

Hyun-Seon Jang^{1,4}, Ji-Yeon Kim¹, Joong-Ki Kook^{2,4},
So Young Yoo², Hwa-Sook Kim², Su-Gwan Kim^{3,4}, Byung-Ock Kim^{1,4}

Department of Periodontology¹, Department of Oral Biochemistry²,
Department of Oral and Maxillofacial Surgery³, Oral Biology Research Institute⁴,
Dentistry of College, Chosun University

The purpose of this study was to investigate and compare the frequency of 4 periodontal pathogens in the supra- and subgingival plaque in periodontally healthy subjects. Twenty adult individuals aged 22 to 28 years (mean age 23.65 years) participated in this study. All subjects had no pocket sites more than 3 mm deep, and the sites selected for sampling were all negative for bleeding. After drying and isolation of the sites with cotton rolls, supragingival plaque was sampled using sterile periodontal curette. Each plaque sample was placed in individual tubes containing 500 ml of 1X PBS. After removal of the supragingival sample and any remaining supragingival plaque, subgingival plaque samples were taken from the same sites using sterile curette and placed in similar individual tubes. Identification of 4 putative periodontal pathogens from the samples was performed by polymerase chain reaction based on 16S rDNA. *Chi-square* test was employed to identify significant explanatory variables for the presence of the 4 periodontal pathogens. The data show that *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Fusobacterium nucleatum* occurred in 16.9%, 14.4%, 52.5%, and 80.6%, respectively. No significant differences were noted in the periodontal pathogens between supra- and subgingival plaques according to the kind of teeth. However, the incisors were at higher risk for harboring *F. nucleatum* ($p < 0.05$). Conclusion: These results reveal that anaerobic periodontal pathogens can be detected in supragingival plaques. Supragingival plaque may function as a reservoir of periodontopathogens.

Key Words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Fusobacterium nucleatum*, Periodontopathogens, Young adults