

# Ribotypisierung von *Fusobacterium nucleatum*-Isolaten aus parodontal gesunden und erkrankten Probanden

## Zusammenfassung

*Fusobacterium nucleatum* ist eine der am häufigsten isolierten Bakterienarten in subgingivaler Plaque und wird sowohl in aktiven parodontalen Läsionen als auch in gesunden Stellen nachgewiesen. Derzeit wird *F. nucleatum* in fünf Subspezies unterteilt. Erste Experimente liessen eine Assoziation zwischen gewissen Subspezies und parodontalen Erkrankungen respektive einem gesunden Status vermuten. Mehrere Indizien deuten jedoch darauf hin, dass *F. nucleatum*-Isolate eine grössere genetische Heterogenität besitzen als ursprünglich angenommen. Damit scheint diese Unterteilung und die vermutete Assoziation nicht ausreichend gesichert zu sein.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob klonale Unterschiede zwischen humanen klinischen *F. nucleatum*-Isolaten aus parodontal gesunden und parodontal erkrankten Probanden zu finden sind. Dazu wurden 23 *F. nucleatum*-Isolate aus parodontal gesunden und 17 Isolate aus parodontal erkrankten Probanden mithilfe der Ribotypisierung untersucht. Zwischen den getesteten Isolaten herrschte eine grosse genetische Heterogenität, wobei jedoch einige der Isolate, welche von parodontal gesunden Probanden stammten, genotypisch identisch waren. Klonale Unterschiede zwischen Isolaten aus parodontal erkrankten gegenüber denjenigen von gesunden Probanden wurden nicht festgestellt.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 113: 953–957 (2003)

Schlüsselwörter: *Fusobacterium nucleatum*, Southern blot, Ribotypisierung, Parodontitis

Zur Veröffentlichung angenommen: 19. Mai 2003

Korrespondenzadresse:

Dr. Frauke Berres

Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie, Zentrum für Zahnmedizin der Universität Basel, Hebelstr. 3, CH-4056 Basel

Tel. 061/267 26 19, Fax 061/267 26 59

E-Mail: Frauke.Berres@unibas.ch

FRAUKE BERRES<sup>a</sup>, GRÉGORY RESCH<sup>b</sup>, MARTIN RUPPERT<sup>a</sup>, JÜRIG MEYER<sup>b</sup> und EVA M. KULIK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie

<sup>b</sup> Institut für Präventivzahnmedizin und Orale Mikrobiologie, Zentrum für Zahnmedizin der Universität Basel

## Einleitung

*Fusobacterium nucleatum*, ein gram-negatives, unbewegliches, obligatorisch anaerobes Stäbchen, kommt bei einem breiten Spektrum von klinischen Infektionen vor (BOLSTAD et al. 1996, CITRON 2002). So wird *F. nucleatum* bei peritonsillären Abszessen, septischer Arthritis, Leberabszessen, intrauterinen Infektionen, Infektionen der Harnwege, Pericarditis, Endocarditis oder Lungeninfektionen isoliert (BOLSTAD et al. 1996). Diese Assoziation mit klinischen Infektionen deutet auf eine pathogene Rolle für *F. nucleatum* hin, Virulenzmechanismen sind jedoch bisher weitgehend unbekannt (CITRON 2002, KAPATRAL et al. 2002).

Auch in der Mundhöhle ist *F. nucleatum* eine der am häufigsten nachgewiesenen Bakterienarten und kommt nicht nur in subgingivaler, sondern auch in supragingivaler Plaque vor (MOORE & MOORE 1994, ROGERS 1998). Obwohl der am häufigsten isolierte Keim in aktiven parodontalen Läsionen (DZINK et al. 1985), ist die genaue parodontopathogene Bedeutung dieses Bakteriums noch nicht geklärt. So wird *F. nucleatum* einerseits bei parodontal gesunden Probanden gefunden, andererseits sowohl in aktiven parodontalen Läsionen, als auch in erfolgreich behandelten oder gesunden Stellen derselben Probanden nachgewiesen (DZINK et al. 1985 & 1988, MOORE & MOORE 1994, SUCHETT-KAYE et al. 1999). Da *F. nucleatum*-Isolate eine grosse genetische Heterogenität aufwiesen, schlugen DZINK et al. (1988) die Einteilung in verschiedene Unterarten vor. Gegenwärtig wird *F. nucleatum* in die fünf Subspezies *nucleatum*, *polymorphum*, *fusiforme*, *vincentii* und *animalis* eingeteilt (DZINK et al. 1990, GHARBA & SHAH 1992). Die Hypothese von DZINK et al. (1988), dass gewisse Subtypen mit parodontalen Erkrankungen und andere mit einem parodontal gesunden Status assoziiert sein könnten, ist jedoch bisher nicht bestätigt worden (DZINK et al. 1988, GHARBA et al. 1990, MOORE & MOORE 1994, GEORGE et al. 1997, ROQUES et al. 2000).

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob zwischen 40 humanen klinischen *F. nucleatum*-Isolaten aus parodontal gesunden und parodontal erkrankten Probanden durch Ribotypisierung (BINGEN et al. 1994) klonale Unterschiede nachweisbar sind. Diese Methode zur Analyse der Heterogenität von Isolaten wurde bei *F. nucleatum* bereits zur Untersuchung der genetischen Heterogenität (THURNHEER et al. 1999) und zur klonalen Analyse von Isolaten aus parodontal gesunden Probanden (SUCHETT-KAYE et al. 1998) eingesetzt.

## Materialien und Methoden

### Probanden und Probengewinnung

Von 17 parodontal erkrankten Probanden der Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie des Zentrums für Zahnmedizin der Universität Basel (Sondierungstiefen  $\geq 5$  mm; Alter zwischen 22 und 74 Jahren [Mittelwert 47,3 Jahre, 10 weibliche und 7 männliche Probanden] mit chronischer, aggressiver oder nekrotisierender Parodontitis) wurde je ein *F. nucleatum*-Isolat ausgewählt, das im Rahmen der mikrobiellen Untersuchung der Taschenflora isoliert worden war. Die Probenentnahme erfolgte subgingival mit sterilen Papierspitzen (Roeko, Langenau, Deutschland) an der tiefsten Stelle pro Quadrant, nachdem visuell sichtbare, supragingivale Plaque entfernt worden war. Eine parodontale Therapie hatte zu diesem Zeitpunkt noch nicht begonnen.

Als Vergleichsgruppe dienten 48 parodontal gesunde freiwillige Probanden (Sondierungstiefen  $\leq 4$  mm; Alter zwischen 18 und 46 Jahren [Mittelwert 26,4 Jahre, 24 weibliche und 24 männliche Probanden]), bei denen supragingivale Plaque der Glattflächen und Zahnzwischenräume mit einer sterilen Kürette entnommen und gepoolt wurde. Ausgeschlossen wurden Probanden mit sichtbar entzündeter Gingiva oder parodontal erkrankten Stellen.

Der Transport aller Proben erfolgte in 0,5 ml Thioglykolat-Bouillon (Oxoid, Basel, Schweiz).

### Isolation und Wachstumsbedingungen

Alle Proben wurden für eine Minute auf einem Vortexgerät gemischt, auf CVE-Selektivplatten (WALKER et al. 1979) ausgestrichen und unter anaeroben Bedingungen (10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>,

80% N<sub>2</sub>) während 5–7 Tagen bei 36 °C inkubiert. Die Identifizierung der *F. nucleatum*-Isolate erfolgte mithilfe der Koloniemorphologie, der Gramfärbung und des rapid ID 32 A Kits (bioMérieux, Genf, Schweiz) nach Vorschrift des Herstellers.

Als Referenzstämme dienten *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256 und *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190. Die Kultivierung der Test- und Referenzstämme erfolgte auf Humanblutagarplatten (Columbia Agar Base [BBL Becton Dickinson, Basel, Schweiz] ergänzt mit 4 mg/l Hemin, 1 mg/l Menadion und 50 ml/l Humanblut).

### Isolation der genomischen DNA, Southern blot-Hybridisierung und Ribotypisierung

Jeweils 2 ml einer Suspension der zu untersuchenden Bakterien ab Humanblutagarplatte in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), die einer Trübung von 5 nach McFarland entsprachen, wurden zentrifugiert und die genomische DNA mithilfe des QIAGEN DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (QIAGEN AG, Basel, Schweiz) nach Angaben des Herstellers isoliert.

1 µg der bakteriellen DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *EcoRV* oder *HindIII* (Roche, Rotkreuz, Schweiz) nach Herstellerangaben geschnitten. 25 µl jeder Probe wurde auf einem 0,7% Agarosegel in TBE-Puffer (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei konstanter Spannung (20V, 16h) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschliessend mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Nach der Depurination (30 Minuten in 250 mM HCl), Denaturierung (30 Minuten in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl) und Neutralisation (30 Minuten in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris, pH 7,5) wurde die DNA über einen kapillaren Transfer mit 2×SSC (30 mM Natriumcitrat/300 mM NaCl, pH 7,0) über Nacht auf einen Nylonfilter (Hybond-N+, Amersham Biosciences, Dübendorf, Schweiz) übertragen. Anschliessend wurde die Membran bei 80 °C für zwei Stunden gebacken.

Als Gensonde diente das Plasmid pKK3535 (BROSIOUS et al. 1981), welches ein rRNA-Operon von *Escherichia coli* enthält. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe des QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN AG) isoliert. Die Hybridisierung und der Nachweis der entstandenen Hybride erfolgte mit dem ECL<sup>™</sup> Direct Nucleic Acid Kits (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurde die Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) exponiert.

Für die Auswertung wurden die erhaltenen Bandenmuster in eine 0/1-Matrix (1, Bande anwesend; 0, Bande abwesend) übertragen. In diese Auswertung wurden nur eindeutige Banden im Bereich von 0,5 bis 8 kb einbezogen. Als Vergleich diente *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256, welcher als Kontrollstamm auf jedem Gel mit aufgetragen wurde. Eine Cluster-Analyse dieser Matrix wurde mit der UPGMA-Methode (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means) im PAUP-Software-Paket (Version 4.0b8a für Macintosh) durchgeführt (SWOFFORD 2002).

## Resultate

Von 48 parodontal gesunden Probanden wurden bei 26 *F. nucleatum* isoliert. Bei elf dieser Probanden und bei zehn der 17 parodontal erkrankten konnten auf Grund morphologischer Unterschiede in der Bakterienkultur zwischen zwei und fünf verschiedene Isolate unterschieden werden. Für die hier beschriebene Untersuchung wurde jedoch bei den 17 parodontal

erkrankten und bei 23 gesunden Probanden ein Isolat pro Proband zufällig ausgewählt und analysiert.

Das mit *EcoRI* erhaltene Bandenmuster einiger repräsentativer Isolate ist in Abbildung 1 dargestellt. Insgesamt resultierten aus den Ergebnissen aller drei verwendeten Restriktions-Endonukleasen 40 distinkte Bandenpositionen, welche in eine binäre Datenmatrix aufgenommen wurden. Die mittels UPGMA-Clusteranalyse paarweise berechneten Ähnlichkeiten sind in Abbildung 2 grafisch dargestellt. Etwa ein Viertel der getesteten Stämme wurden einer Gruppe mit *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953 zugeordnet. Den andern drei Referenzstämmen wurden nur wenige Isolate zugeordnet. Die *F. nucleatum*-Isolate aus parodontal gesunden und parodontal erkrankten Probanden bildeten keine separaten Gruppen und es konnten keine klonalen Unterschiede festgestellt werden. Im Allgemeinen war eine grosse genetische Heterogenität der Ribotypen-Muster zu erkennen, wobei jedoch dreimal zwei und einmal drei Isolate, welche von parodontal gesunden Probanden stammten, ein jeweils identisches Bandenmuster zeigten.

## Diskussion

Bakterienisolate, die viele identische phänotypische und genetische Merkmale aufweisen, aber unabhängig voneinander aus

unterschiedlichen Quellen, an unterschiedlichen Orten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert wurden, lassen für diese Identität einen gemeinsamen Ursprung vermuten (ORSKOV & ORSKOV 1983). Solche Bakterienisolate werden als Klone bezeichnet. Die in dieser Studie untersuchten *F. nucleatum*-Isolate zeigten jedoch eine grosse genetische Heterogenität und die Isolate aus parodontal gesunden oder erkrankten Probanden bildeten keine getrennten Gruppen (Abb. 2).

Einige der supragingivalen Isolate von parodontal gesunden Probanden waren jedoch genotypisch identisch (Abb. 2). Identische Ribotyp-Muster sind ebenfalls bei einer Analyse der Verteilung von *F. nucleatum*-Stämmen in vier gesunden Familien mit optimaler Mundhygiene nachgewiesen worden (SUCHETTKAYE et al. 1999). Dabei hatten zehn der elf Kinder ein identisches Ribotyp-Muster zu mindestens einem der Elternteile, während zwischen Ehegatten die Übereinstimmung unter Isolat von *F. nucleatum* geringer war. Bei den parodontal gesunden Probanden in der vorliegenden Studie handelte es sich um Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen sowie um Studierende des Zentrums für Zahnmedizin. Aus den vorliegenden Daten kann allerdings nicht geschlossen werden, ob hier eine Übertragung der Stämme unter den Probanden stattgefunden hat oder ob die genetische Heterogenität bei Isolat von parodontal Gesunden generell geringer ist. Der Vergleich weiterer Isolate aus

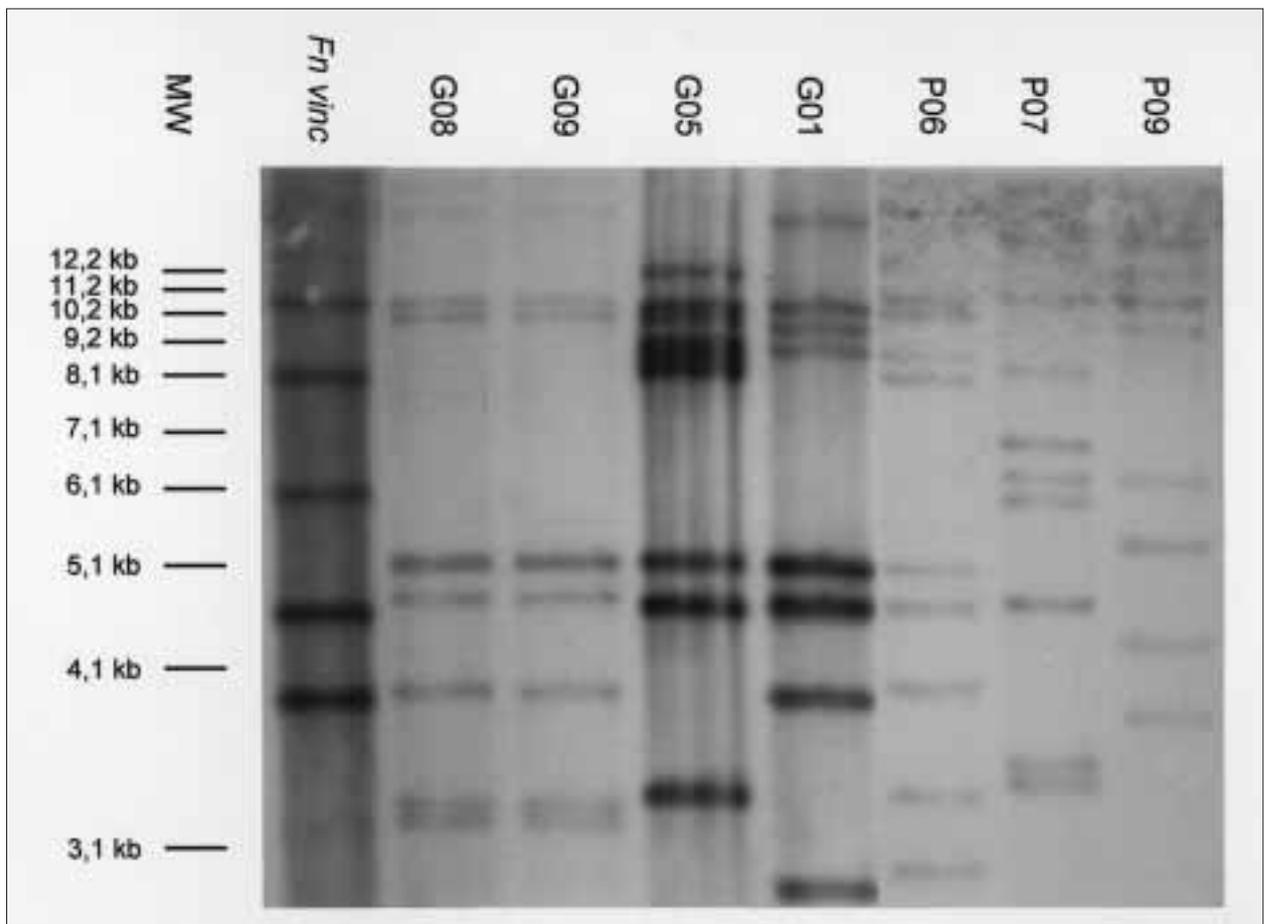


Abb. 1 *EcoRI*-Ribotyp Muster von *F. nucleatum*-Isolaten von parodontal gesunden (G01, G05, G08, G09) und von parodontal erkrankten Probanden (P06, P07, P09), sowie von *Fn vinc* (*F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256). MW = Molekulargewichtsmarker.

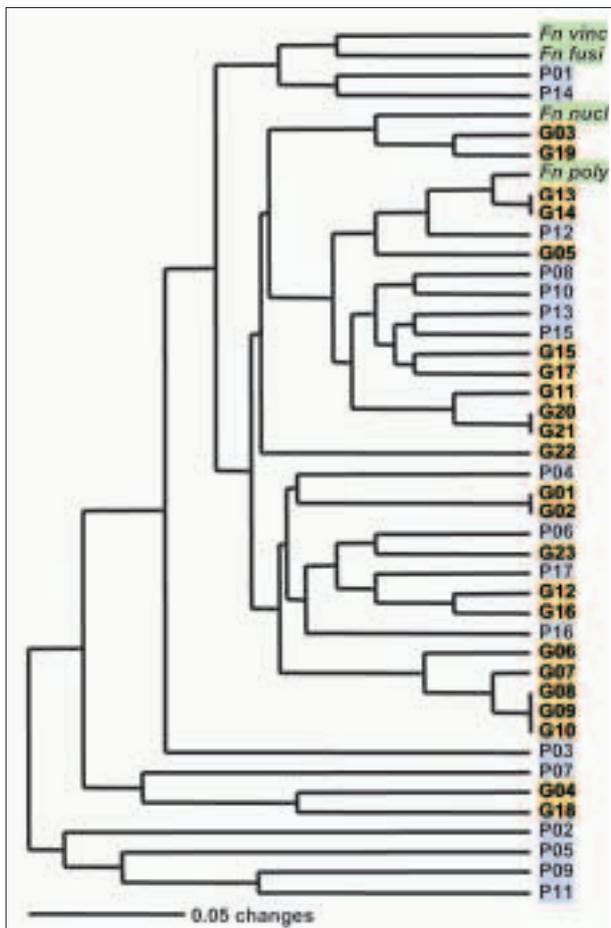


Abb. 2 Dendrogramm der untersuchten *F. nucleatum*-Isolate. Isolate, welche aus parodontal gesunden Probanden stammen, sind mit «G» beschriftet (gelb unterlegt), solche aus parodontal erkrankten Probanden mit «P» (violett unterlegt). *Fn nucl*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586; *Fn vinc*, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256; *Fn fusi*, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* ATCC 51190; *Fn poly*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953 (grün unterlegt). Der Strich repräsentiert 2 Änderungen auf 40 Bandenpositionen.

parodontal gesunden Probanden, welche entweder eine enge Verbindung zueinander haben oder völlig unabhängig voneinander sind, könnte diese Frage beantworten.

Die Beobachtung, dass *F. nucleatum* nicht nur in erkrankten Stellen, sondern auch in gesunden Stellen nachgewiesen werden kann, führte zur Formulierung der Hypothese der unterschiedlichen Pathogenität von *F. nucleatum*-Isolaten (DZINK et al. 1988). In der Folge wurde in einer Reihe von Studien der Zusammenhang zwischen Subspezies und Pathogenität untersucht. GHARBLIA et al. (1990) identifizierten *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* bei neun Isolaten aus Wurzelkanälen und parodontalen Taschen, während es sich bei Isolaten aus der Plaque von gesunden Probanden um *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* (19 Isolate), *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (zwei Isolate) oder *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* (zwei Isolate) handelte. MOORE & MOORE (1994) identifizierten *F. nucleatum* subsp. *vincentii* als die am häufigsten nachgewiesene Unterart im gingivalen Sulcus,

gefolgt von den Subspezies *nucleatum* und *polymorphum* im Verhältnis von etwa 7:3:2, wobei sie keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Pathogenität der Subspezies fanden. ROQUES et al. (2000) untersuchten 49 *F. nucleatum*-Isolate aus der subgingivalen Plaque von 40 erwachsenen Parodontitis-Patienten und fanden *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (34,7%) und *F. nucleatum* subsp. *vincentii* (26,5%) als die häufigsten Unterarten in der parodontalen Tasche. Die Autoren konnten keine Korrelation zwischen Subspezies und zwei möglichen Virulenzfaktoren (Hemmagglutinations-Muster und Buttersäure-Produktion) finden. Falls Unterschiede in der Pathogenität bestehen, ist es denkbar, dass sich das Genom von pathogenen *F. nucleatum*-Isolaten nur gering von demjenigen nichtpathogener Isolate unterscheidet. Das Genom von *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 ist 2,17 Mb lang und enthält fünf *rrn* Loci (KAPATRAL et al. 2002). Wahrscheinlich werden Mutationen in Virulenzgenen oder ihren regulatorischen Elementen nicht erfasst, da nur etwa 1% des Genoms durch die Ribotypisierung abgedeckt wurde.

Die Taxonomie von *F. nucleatum* und speziell die Einteilung in fünf Subspezies wird zunehmend in Frage gestellt, da sich die Typenstämmen als nicht repräsentativ erwiesen (MORRIS et al. 1997, ROGERS 1998, THURNHERR et al. 1999, CONRADS et al. 2002). Zudem zeigte sich, dass die Heterogenität der Isolate grösser war als bei der ersten Einteilung angenommen (MORRIS et al. 1997, GEORGE et al. 1997, SUCHETT-KAYE et al. 1998, THURNHERR et al. 1999), was auch unsere Studie bestätigt. Falls eine Assoziation besonders virulenter Stämme mit erkrankten Stellen besteht, ist zuerst eine bessere systematische Unterteilung von *F. nucleatum* nötig, bevor bestimmte Subspezies mit parodontalen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Wahrscheinlich wird eine zuverlässige Assoziation aber erst auf Grund der Kenntnisse spezifischer Virulenzgene möglich sein.

## Verdankungen

Wir danken Krystyna Lenkeit, Irmgard Hauser-Gerspach und Theres Eberle für die Unterstützung bei der Laborarbeit. Zudem möchten wir Martin Altwegg für die Bereitstellung des Plasmids pKK3535 und Rudolf Gmür für die *F. nucleatum*-Referenzstämme danken.

## Summary

BERRES F, RESCH G, RUPPERT M, MEYER J, KULIK E M: **Ribotyping of *Fusobacterium nucleatum* isolates from periodontally healthy and diseased individuals** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 113: 953–957 (2003)

*Fusobacterium nucleatum* is one of the most frequently cultured bacteria from subgingival plaque. It can be isolated from active periodontal lesions as well as from healthy sites. Currently, *F. nucleatum* has been divided into five subspecies. An early hypothesis suggested an association between certain subspecies and periodontal disease or health. On the other hand, a broad heterogeneity between *F. nucleatum* isolates has been suggested, so that the subspeciation scheme and therefore the proposed association may not be valid.

The purpose of the present study was to analyze if clonal differences exist between human *F. nucleatum* isolates from either periodontally healthy or diseased individuals. 23 *F. nucleatum* isolates from periodontally healthy and 17 isolates from periodontally diseased individuals were analysed by ribotyping. A broad genetic heterogeneity was present, although some of the isolates from periodontally healthy individuals were genotypi-

cally identical. However, no clonal differences between isolates from periodontally healthy or diseased individuals was detected.

## Résumé

*Fusobacterium nucleatum* est l'une des bactéries les plus fréquemment rencontrées dans la plaque dentaire subgingivale. Elle peut être isolée à partir de prélèvements effectués dans des sites atteints de lésions parodontales mais également dans des sites sains. A l'heure actuelle, cinq sous-espèces de *F. nucleatum* sont répertoriées. Depuis longtemps, une hypothèse a été formulée selon laquelle certaines sous-espèces pourraient être plus particulièrement associées à des maladies parodontales alors que d'autres sous-espèces seraient plus souvent associées à un parodontium sain. Parallèlement, une hétérogénéité plus vaste entre les isolats de *F. nucleatum* a été suggérée. Ceci semblerait indiquer que la classification actuelle en sous-espèces, et de ce fait les associations proposées, ne seraient pas valables. Le but de l'étude présentée ici était de vérifier l'existence de différences clonales entre des isolats de *F. nucleatum* issus de patients sains ou atteints d'une maladie parodontale. 23 isolats issus de patients sains et 17 issus de patients malades ont été analysés par la technique du ribotypage. Bien que quelques isolats provenant de patients sains étaient génotypiquement identiques, une grande hétérogénéité a été observée. Cependant, aucune différence clonale entre les isolats de patients sains et malades n'a été détectée.

## Literaturverzeichnis

- BINGEN E H, DENAMUR E, ELION J: Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev* 7: 311–327 (1994)
- BOLSTAD A I, JENSEN H B, BAKKEN V: Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9: 55–71 (1996)
- BROSIOUS J, ULLRICH A, RAKER M A, GRAY A, DULL T J, GUTELL R R, NOLLER H F: Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rnnB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid* 6: 112–118 (1981)
- CITRON D M: Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *Fusobacterium*. *Clin Infect Dis* 35(Suppl 1): S22–S27 (2002)
- CONRADS G, CLAROS M C, CITRON D M, TYRRELL K L, MERRIAM V, GOLDSTEIN E J C: 16S–23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 493–499 (2002)
- DZINK J L, SHEENAN M T, SOCRANSKY S S: Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.. *Int J Syst Bacteriol* 40: 74–78 (1990)
- DZINK J L, SOCRANSKY S S, HAFFAJEE A D: The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15: 316–323 (1988)
- DZINK J L, TANNER A C R, HAFFAJEE A D, SOCRANSKY S S: Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 12: 648–659 (1985)
- GEORGE K S, REYNOLDS M A, FALKLER W A: Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting and clonal analysis of oral *Fusobacterium nucleatum* isolates. *Oral Microbiol Immunol* 12: 219–226 (1997)
- GARBIA S E, SHAH H N: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol* 42: 296–298 (1992)
- GARBIA S E, SHAH H N, LAWSON P A, HAAPASALO M: The distribution and frequency of *Fusobacterium nucleatum* subspecies in the human oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 5: 324–327 (1990)
- KAPATRAL V, ANDERSON I, IVANOVA N, REZNIK G, LOS T, LYKIDIS A, BHATTACHARYA A, BARTMAN A, GARDNER W, GRECHKIN G, ZHU L, VASIEVA O, CHU L, KOGAN Y, CHAGA O, GOLTSMAN E, BERNAL A, LARSEN N, D'SOUZA M, WALUNAS T, PUSCH G, HASELKORN R, FONSTEIN M, KYRPIDES N, OVERBEEK R: Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol* 184: 2005–2018 (2002)
- MOORE W E C, MOORE L V H: The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5: 66–77 (1994)
- MORRIS M L, ANDREWS R H, ROGERS A H: Investigations of the taxonomy and systematics of *Fusobacterium nucleatum* using allozyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 47: 103–110 (1997)
- ORSKOV F, ORSKOV I: Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other bacteria. *J Infect Dis* 148: 346–357 (1983)
- ROGERS A H: Studies on fusobacteria associated with periodontal diseases. *Aust Dent J* 43: 105–109 (1998)
- ROQUES C G, EL KADDOURI S, BARTHET P, DUFFORT J-F, ARELLANO M: *Fusobacterium nucleatum* involvement in adult periodontitis and possible modification of strain classification. *J Periodontol* 71: 1144–1150 (2000)
- SUCHETT-KAYE G, DÉCORET D, BARSOTTI O: Clonal analysis by ribotyping of *Fusobacterium nucleatum* isolates obtained from healthy young adults with optimal plaque control. *J Periodont Res* 33: 179–186 (1998)
- SUCHETT-KAYE G, DÉCORET D, BARSOTTI O: Intra-familial distribution of *Fusobacterium nucleatum* strains in healthy families with optimal plaque control. *J Clin Periodontol* 26: 401–404 (1999)
- SWOFFORD D L: PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), 4.0 beta. Sinauer Associates, Sunderland, MA (2002)
- THURNHEER T, GUGGENHEIM B, GRUICA B, GMÜR R: Infinite serovar and ribotyping heterogeneity among oral *Fusobacterium nucleatum* strains? *Anaerobe* 5: 79–92 (1999)
- WALKER C B, RATLIFF D, MUELLER D, MANDELL R, SOCRANSKY S S: Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *J Clin Microbiol* 10: 844–849 (1979)