Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

بررسی میزان فراوانی باکتری‌های پریودونتوپاتوژن در بیماران مبتلا به عفونت پریودونتال با استفاده از روش کشت و PCR

امیر علیرمضانی[۱]- محمدحسین سالاری[۲]- دکتر محمدرضا پورمند[۷]- دکتر زینب کدخدا[۳]- عباس رحیمی فروشانی[۴]- فرزانه امین هراتی[۵]- صدیقه قورچیان[۶]- زهرا پاکباز[۱]- سید سعید اشراقی[۷†]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۲- استاد گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار گروه آموزشی پریودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۴- استاد گروه آموزشی آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد قارچ شناسی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۶- کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

۷- دانشیار گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران

Prevalence of periodontopathogenic bacteria in patients suffering from periodontitis using culture and PCR methods

Amir Aliramezani[1], Mohammad Hosein Salari[2], Mohammad Reza Pourmand[7], Zeinab Kadkhoda[3], Abbas Foroushani[4], Farzaneh Aminharati[5], Sedigheh Ghourchian[6], Zahra Pakbaz[1], Saeed Eshraghi[7†]

1- Student of Medical microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Statistics and Epidemiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences
5- MSc in Mycology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6- BSc Lab Sciences, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7†- Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (eshraghs@tums.ac.ir)

Background and Aims: Periodontitis is one of the most common oral diseases with the various incidence rates in different populations. A number of bacteria are considered as the major etiologic agents of periodontitis. The aim of the present study was to determine the prevalence of periodontopathogen bacteria in patients using both PCR and culture techniques.

Materials and Methods: In this study, one-hundred patients (including 62 females and 38 males with an average age of 49±11.5 years) with adult periodontitis referred to periodontics department of School of Dentistry/Tehran University of Medical Sciences were investigated. The samples were taken and sent immediately to the laboratory for culture and molecular evaluation. The PCR was performed using specific primers and the statistical analysis of data was performed using SPSS statistic software and McNemar test.

Results: The results demonstrated that the total detection rate in culture method was 64%. The rate of Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) was 28% which was significantly higher than that of Porphyromonas gingivalis (Pg) (6%) and Prevotella intermedia (Pi) (3%). 27% of cases showed mixed bacterial growth. 65% of patients were positive using molecular method. The rate of Aa (30%) was significantly higher than that of Pg (7%) and Pi (5%). The mixed PCR positive rate containing of Aa, Pg and Pi was (23%).

Conclusion: In this study, it was found that most of the bacteria isolated using culture and molecular methods were Aa, Pg and Pi, respectively. Although the detection frequencies of both techniques were similar, the specificity, sensitivity and bacterial detection speed of the PCR technique is obviously higher. Therefore, the use of molecular techniques is strongly recommended. However, both techniques seem to be suitable for microbiological diagnostics.

Key Words: Periodontitis; Actinomycetemcomitans; Porphyromonas gingivalis (Pg); Prevotella intermedia (Pi); Culture; Polymerase Chain Reaction (PRC)

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2012;25(3):159-165

† مولف مسوول: نشانی: تهران- خیابان انقلاب- خیابان قدس- دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه آموزشی پاتوبیولوژی
تلفن: ۸۸۹۹۴۸۲۳ نشانی الکترونیک: eshraghs@tums.ac.ir

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

چکیده

زمینه و هدف: پریودونتیت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهان و دندان می‌باشد که میزان شیوع آن در جوامع مختلف متغیر بوده و باکتری‌های زیادی در اتیولوژی این بیماری دخیل هستند. هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان فراوانی و شناسایی باکتری‌های غالب پریودونتوپاتوژن در مبتلایان به پریودونتیت با استفاده از دو روش کشت و مولکولی بود.

روش بررسی: در این بررسی صد نمونه از صد بیمار مبتلا به پریودونتیت بالغین شامل ۶۲ نفر زن و ۳۸ نفر مرد با دامنه سنی ۷۵-۲۴ سال (میانگین ۱۱/۵±۴۹ سال) مراجعه‌کننده به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران برداشت و با استفاده از دو روش کشت و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون McNemar صورت گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه ۶۳ مورد به روش کشت، مثبت شدند که به ترتیب از ۲۹ بیمار اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس (Aa)، از ۲۰ بیمار پورفیرومونواس ژنژیوالیس (Pg) و پروتلا اینترمدیا (Pi) جدا شد. به علاوه از ۱۴ بیمار دو یا چند گونه باکتری به صورت هم زمان جدا شد. در روش مولکولی از این تعداد نمونه بیمار ۶۴ مورد مثبت شد که به ترتیب از ۱۸ بیمار Aa، از ۱۳ بیمار Pg و Pi جدا شد، به علاوه از ۳۳ بیمار دو یا چند گونه باکتری تواماً جدا گردید.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش فراوانی باکتری‌های جدا شده در هر دو روش کشت و مولکولی به ترتیب مربوط به Aa، Pg و نیز Pi به دست آمد. اگر چه در این مطالعه اختلاف معنی‌داری بین روش کشت و مولکولی مشاهده نشد، ولی در تشخیص باکتری‌های مذکور روش مولکولی دارای دقت، اطمینان و سرعت قابل‌توجه می‌باشد. به هر حال برحسب شرایط و امکانات آزمایشگاه می‌توان از یک یا هر دو روش در تشخیص باکتری استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: پریودنتیت؛ کشت؛ PCR (Polymerase Chain Reaction)؛ باکتری‌های بی‌هوازی (پورفیرومونواس ژنژیوالیس، پروتلا اینترمدیا)؛ باکتری کاپنوفیل (اکتینومایستم کومیتنس)

وصول: ۹۰/۰۶/۱۵ اصلاح نهایی: ۹۱/۰۵/۰۱ تأیید چاپ: ۹۱/۰۵/۰۴

مقدمه

پریودونتیت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهان و از عوامل اصلی از دست دادن دندان در کشورهای پیشرفته و همچنین در حال توسعه می‌باشد. میزان شیوع این بیماری در افراد مختلف با توجه به شرایط اجتماعی، اقتصادی و فرهنگی و همچنین سن و جنس متفاوت است (۱،۲). در این بیماری بافت‌های نگهدارنده دندان مورد تهاجم میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. علایم بالینی این بیماری عبارت است از التهاب لثه همراه با خونریزی، لقی دندان، تحلیل رفتن لثه، بدبو شدن تنفس و بدمزگی دهان و تخریب استخوان آلوئولی و درنهایت از دست رفتن دندان. مطالعات نشان می‌دهد که حدود ۳۰۰ باکتری در اتیولوژی این بیماری نقش دارند. در میان این گونه‌ها، باکتری‌های کاپنوفیل (اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس، ایکنلا کورودنس و گونه‌های کاپنوسایتوفاگا) و همچنین باکتری‌های بی‌هوازی (پورفیرومونواس ژینژیوالیس، پروتلا اینترمدیا، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، تانرلا فورسی تنسیس،ترپونما دنتیکولا و گونه‌های اکتینومایسس) نقش اساسی را ایفا می‌نمایند (۳،۴). تا سال ۱۹۶۳ میلادی، میکروب‌شناسان معتقد بودند که ترکیب فلور میکروبی در تمام سطوح دهان مشابه است (۱). آنها تمام کوشش خود را روی کشت بزاق متمرکز می‌کردند. زیرا به گمان آنها کشت بزاق می‌توانست فلور دهان را مشخص سازد. از این سال به بعد، با ابداع روش های دقیق نمونه‌برداری و کشت، مشخص شد که بسیاری از گونه‌های باکتریایی فقط در مکان‌های خاصی از دهان تثبیت می‌شوند و کشت‌های بزاقی نیز انعکاس فلور یافت شده بر روی بافت‌های نرم دهان است و تنها رابطه اندکی با ارگانیسم‌های یافت شده در دهان دارد (۴). بزاق که مهم‌ترین و ماندگارترین منبع غذایی میکرواورگانیسم‌هاست، یک رژیم غذایی ضعیف برای ۲۰۰ تا ۳۰۰ گونه متنوع باکتریایی ساکن یا کلونیزه شده در دهان محسوب می‌شود (۵). ازجمله عواملی که مشاهده و شناسایی این باکتری‌ها را با مشکل مواجه نموده است می‌توان به پیچیدگی فلور زیر لثه‌ایی، مشکل بودن نمونه‌گیری، گران و کمیاب بودن تجهیزات تشخیصی و همچنین سخت رشد بودن باکتری‌های موردنظر اشاره داشت (۵،۶). گزارش می‌شود که بیشتر افراد جامعه در طول عمر خود حداقل یکبار به این بیماری دچار می‌شوند (۶). در بیشتر مطالعات صورت پذیرفته در کشورهای مختلف با جمعیت‌های متفاوت، باکتری‌های اگریگاتی باکتراکتینومایستم کومیتنس، پورفیرومونواس ژینژیوالیس و پروتلا اینترمدیا واجد بیشترین نقش می‌باشند (۷،۸). هدف از انجام این مطالعه، شناسایی باکتری‌های غالب پریودونتوپاتوژن

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

در مبتلایان به پریودونتیت مراجعه‌کننده به درمانگاه تخصصی دندانپزشکی با استفاده از دو روش کشت و PCR بود.

روش بررسی

جمعیت مورد بررسی: در این بررسی ۱۰۰ بیمار مبتلا به پریودونتیت شامل ۶۲ نفر زن و ۳۸ نفر مرد با دامنه سنی ۷۵-۲۴ سال (میانگین ۱۱/۵±۴۹ سال) مراجعه‌کننده به بخش پریودونتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد مطالعه قرار گرفتند. معیارهای نمونه‌گیری از این افراد عدم مصرف آنتی‌بیوتیک به مدت حداقل یک ماه، داشتن عمق پاکت به میزان مساوی یا بیشتر از ۵ میلی‌متر و عدم ابتلا به بیماری سیستمیک بود. داده‌های دموگرافیک از طریق پرسشنامه جمع‌آوری شد. مدت زمان انجام این پژوهش به صورت تقریبی حدود یکسال بوده است. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون McNemar صورت پذیرفت.

روش نمونه‌گیری: پس از شناسایی بیماران مبتلا به پریودونتیت و داشتن معیارهای فوق، توسط دندانپزشک، ابتدا با یک گاز استریل، سطح دندان موردنظر را از ترشحات بزاقی و آلودگی پاک نموده، سپس یک یا دو عدد کن کاغذی (Paper point) استریل به عمق پاکت فرو برده، پس از ۳۰ ثانیه آن را خارج کرده و در محیط ترانسپورت قرار داده شد. محیط ترانسپورت مورد استفاده محیط تایوگلیکولات براث (Thioglycolate Broth) بود که پس از استریل نمودن توسط اتوکلاو، به میزان ۵ میلی‌لیتر در داخل لوله‌های در پیچ‌دار استریل ریخته و قبل از نمونه‌گیری به مدت ۵ دقیقه در آب درحال جوش قرار داده شد. سپس در زمانی کمتر از ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد.

کشت: قبل از انجام کشت محیط انتقالی به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد، سپس با لوپ استاندارد روی محیط‌های انتخابی کشت انجام شد. جهت کشت باکتری‌های بی‌هوازی و کاپنوفیل از محیط پایه بروسلا آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند دفیبرینه استفاده شد، همچنین جهت غنی‌سازی این محیط از سرم اسب به میزان ۵ درصد، ویتامین K_1 و همین استفاده شد.

به منظور انتخابی شدن محیط کشت برای پورفیروموناس ژینژیوالیس از آنتی‌بیوتیک کلیسیتین، برای پروتلا اینترمدیا از ونکومایسین و جهت اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس از باسیتراسین و ونکومایسین استفاده شد. سپس پلیت‌های باکتری‌های کاپنوفیل در جار شمع‌دار و باکتری‌های بی‌هوازی در جار بی‌هوازی حاوی گازپک نوع A، کاتالیزور و اندیکاتور قرار داده شد. پس از ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آزمایش‌های تشخیصی و افتراقی انجام شد.

تست‌های مولکولی: جهت انجام PCR، از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ژن‌های موردنظر طبق جدول ۱ و به منظور استخراج DNA از کیت تجاری (Bioneer, South Korea) استفاده شد.

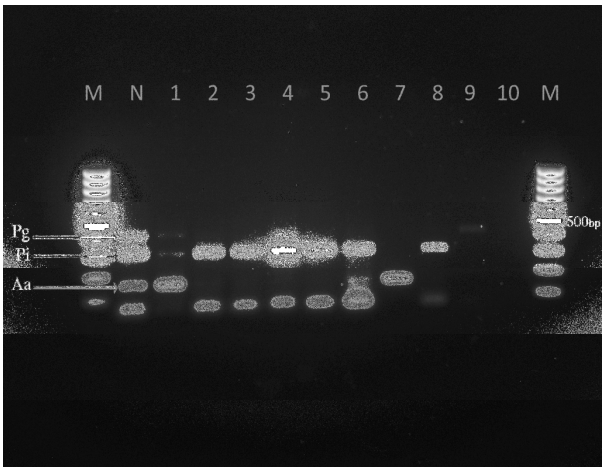
حجم نهایی واکنش PCR به میزان ۲۰ میکرولیتر، مشتمل بر ۱۰ میکرولیتر Master Mix (Qiagen, U.S.A)، ۷ میکرولیتر آب مقطر و ۰/۰۴ میکرومول در میلی‌لیتر از هر کدام از پرایمرها بوده است. واسرشتگی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۴ درجه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله گستردگی (Annealing) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و درنهایت مرحله گستردگی نهایی (Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. تعداد سیکل‌های صورت پذیرفته در دستگاه ترموسایکلر ۳۵ بود، از سویه‌های استاندارد

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده درمطالعه

نام باکتری	مشخصات پرایمر	ژن موردنظر	اندازه محصول PCR
اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس (Aa)	F: 5'-CGCCGTTTTTATTGCTCATT-3' R: 5'-CGACATCGATGGTTTCAAGTT-3'	tbp A1	160 base pair
پروتلا اینترمدیا (Pi)	F: 5'- GGAAATTGTTCGCGAGATGT-3' R: 5'- CATGGCCACCAGCAGGACGC-3'	tna A	317 bp
پورفیروموناس ژینژیوالیس (Pg)	F: 5'- CCAATCGTTTACCCTCAGGA-3' R: 5'- ACGGACATCGAATACCGACT-3'	Conserved hypothetical protein	431 bp

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس ATCC 29523، پروتلا اینترمدیا ATCC 25611 و پورفیرومونـاس ژینژیوالیس ATCC 33277به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از انجام این مراحل در دستگاه ترموسایکلر، محصولات بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TAE الکتروفورز شد و اندازه باندها در حضور مارکر ۱۰۰ bp (Fermentas, Lithuania) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- شناسایی DNA باکتری‌های مورد مطالعه (بی‌هوازی+کاپنوفیلAa, Pi+Pg) با تلقیح آنها در ژل ۱/۵ درصد آگاروز

یافته‌ها

در این بررسی مشخص شد که بیشترین میزان جداسازی این باکتری‌ها در گروه سنی ۵۰ تا ۵۹ صورت گرفته است. شیوع باکتری‌های اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس، پروتلا اینترمدیا و پورفیرومونـاس ژینژیوالیس در این تحقیق با دو روش کشت و مولکولی بررسی و در جدول‌های ۲ و ۳ نمایه شده است.

نتیجه کشت: از میان ۶۲ بیمار زن مورد مطالعه، ۶۲/۹ درصد از لحاظ کشت مثبت بوده که ۳۵/۹ درصد دچار عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی، ۳۸/۵ درصد باکتری‌های کاپنوفیل و ۲۵/۶ درصد باکتری‌های بی‌هوازی به اضافه کاپنوفیل بودند، در حالی که از میان ۳۸ بیمار مرد مورد مطالعه، ۶۳/۲ درصد از لحاظ کشت مثبت بودند که ۲۵ درصد دچار عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی، ۵۸/۳ درصد باکتری‌های کاپنوفیل و ۱۶/۷ درصد باکتری‌های بی‌هوازی به اضافه کاپنوفیل می‌باشند. این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۵۷).

نتیجه مولکولی: از میان ۶۲ بیمار زن مورد مطالعه، ۶۳/۹ درصد از لحاظ PCR مثبت بودند که ۲۳/۱ درصد دچار عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی، ۲۰/۵ درصد باکتری‌های کاپنوفیل و ۵۶/۴ درصد باکتری‌های بی‌هوازی به اضافه کاپنوفیل بودند، در حالی که از میان ۳۸ بیمار مرد مورد مطالعه، ۶۵/۸ درصد از لحاظ PCR مثبت بودند که ۱۶ درصد دچار عفونت‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی، ۴۰ درصد باکتری‌های کاپنوفیل و ۴۴ درصد باکتری‌های بی‌هوازی به اضافه باکتری‌های کاپنوفیل بودند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۵۱).

در این پژوهش مشخص شد که تفاوت درصد جداسازی باکتری‌ها در روش کشت و مولکولی حدود ۱ درصد می‌باشد و این تفاوت‌ها فاقد معنی از لحاظ آماری بود (P=۰/۴۲).

روش کشت استاندارد طلایی جهت جداسازی این باکتری‌ها می‌باشد ولی به جهت سرعت بسیار بیشتر و اطمینان بالاتر توصیه بر این است که روش مولکولی در کنار روش کشت مدنظر قرار گیرد.

جدول ۲- فراوانی مطلق و نسبی باکتری‌های جدا شده براساس گروه سنی به روش کشت آزمایشگاهی

نوع باکتری / گروه سنی	بی‌هوازی Pi+Pg تعداد (درصد)	کاپنوفیل Aa تعداد (درصد)	بی‌هوازی+کاپنوفیل Aa, Pi+Pg تعداد (درصد)	جمع
۲۰-۲۹	۰ (۰)	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	۲ (۱۰۰)
۳۰-۳۹	۶ (۳۷/۵)	۶ (۳۷/۵)	۴ (۲۵)	۱۶ (۱۰۰)
۴۰-۴۹	۳ (۱۷/۶)	۹ (۵۲/۹)	۵ (۲۹/۴)	۱۷ (۱۰۰)
۵۰-۵۹	۷ (۳۵)	۱۰ (۵۰)	۳ (۱۵)	۲۰ (۱۰۰)
۶۰-۶۹	۳ (۶۰)	۲ (۴۰)	۰ (۰)	۵ (۱۰۰)
>۷۰	۱ (۳۳/۳)	۲ (۶۶/۷)	۰ (۰)	۳ (۱۰۰)
جمع	۲۰ (۳۱/۷)	۲۹ (۴۶)	۱۴ (۲۲/۲)	۶۳ (۱۰۰)

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

جدول ۳- فراوانی مطلق و نسبی باکتری‌های جدا شده براساس گروه سنی به روش مولکولی (PCR)

نوع باکتری / گروه سنی	بی‌هوازی Pi+Pg تعداد (درصد)	کاپنوفیل Aa تعداد (درصد)	بی‌هوازی+کاپنوفیل Aa, Pi+Pg تعداد (درصد)	جمع
۲۰-۲۹	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۱۰۰)	۳ (۱۰۰)
۳۰-۳۹	۶ (۳۵/۳)	۴ (۲۳/۵)	۷ (۴۱/۲)	۱۷ (۱۰۰)
۴۰-۴۹	۰ (۰)	۳ (۲۳/۱)	۱۰ (۷۶/۹)	۱۳ (۱۰۰)
۵۰-۵۹	۴ (۱۸/۲)	۸ (۳۶/۴)	۱۰ (۴۵/۵)	۲۲ (۱۰۰)
۶۰-۶۹	۲ (۳۳/۳)	۱ (۱۶/۷)	۳ (۵۰)	۶ (۱۰۰)
>۷۰	۱ (۳۳/۳)	۲ (۶۶/۷)	۰ (۰)	۳ (۱۰۰)
جمع	۱۳ (۲۰/۳)	۱۸ (۲۸/۱)	۳۳ (۵۱/۶)	۶۴ (۱۰۰)

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه علت اصلی و واقعی بیماری‌های پریودونتال مشخص نیست لیکن به نظر می‌رسد وجود میکروارگانیسم‌ها از یک طرف و نقص سیستم ایمنی از طرف دیگر در ایجاد این بیماری نقش داشته باشند. البته مواردی مانند مصرف دخانیات، افزایش سن، ترشح هورمون‌های جنسی گوناگون، اختلالات ژنتیکی و بیماری‌های سیستماتیک ازجمله دیابت نیز ممکن است در بروز بیماری موثر باشند (۹). در بعضی از موارد به ارثی بودن این بیماری نیز اشاراتی می‌شود(۹،۱۰). به هر حال عامل اتیولوژیک در ایجاد این عفونت‌ها، میکروارگانیسم‌های موجود در پلاک دندانی ساب ژنژیوال (پلاک زیر لثه‌ای) می‌باشد. این فلور باکتریال در هنگام ایجاد بیماری به صورت غالبی چهره پاتوژن خود را نشان داده و با همکاری با یکدیگر می‌توانند باعث عفونت مخلوط در عمق مساوی یا بیشتر از ۵ میلی‌متر دهان و درنهایت ایجاد مشکلاتی همچون از دست دادن دندان شوند (۱۱،۱۲). پژوهشگران در بین این باکتری‌ها، گونه‌های اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس، پروتلا اینترمدیا و پورفیرومونا‌س ژنژیوالیس را عامل اصلی بروز عفونت پریودونتال معرفی می‌کنند (۱۳). گزارش می‌شود که اغلب افراد جامعه در طول عمر خود حداقل یک بار به عفونت پریودونتال مبتلا شده‌اند (۱۴). همچنین مطالعات مشابه نشان می‌دهد که تقریباً ۹۷ درصد موارد از دست دادن دندان با پوسیدگی دندان و یا عفونت پریودونتال ارتباط دارد و این نوع عفونت اغلب به صورت مشارکت چند باکتری پریودونتوپاتوژن می‌باشد (۱۵،۱۶).

در سال ۲۰۱۰، Amel و همکاران (۱۳) در مطالعه بر روی بیماران مبتلا به پریودونتیت در الجزایر به این نتیجه رسیدند که در جمعیت ۲۳۲ نفره مورد بررسی، ۷/۳ درصد دارای اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس، ۴/۲ درصد دارای پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس، ۰/۸ درصد دارای اکتینومایسس اسرائیلی و ۱ درصد دارای اکتینومایسس نیوزیلندی بودند که این مطالعه با پژوهش صورت پذیرفته از نظر غالب بودن جمعیت میکروبی اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس و پورفیرومونا‌س ژینژیوالیس تقریبا همخوانی‌دارد. در سال ۲۰۰۸، Herrera و همکاران (۱۴) در مطالعه بر روی پروفایل میکروبی زیر لثه‌ایی در بیماران مبتلا به پریودونتیت مزمن در شیلی، کلمبیا و اسپانیا به این نتیجه دست یافتند که در جمعیت ۳۷ نفره مورد بررسی در شیلی، ۱۹/۴ درصد دارای ا گریگاتی باکتراکتینومایستم کومیتنس، ۸۳/۸ درصد دارای پورفیرومونا‌س ژنژیوالیس و ۱۹/۴ درصد دارای پروتلا اینترمدیا بود. همچنین در جمعیت ۴۱ نفره مورد بررسی در کلمبیا، درصد باکتری‌های ذکر شده به ترتیب ۱۷/۱، ۶۵/۹ و ۷۲/۵ درصد بود و در جمعیت ۳۶ نفره مورد بررسی در اسپانیا نتایج به ترتیب ۱۶/۷، ۷۷/۸ و ۹۷/۲ درصد از باکتری‌های فوق‌الذکر بود.

در سال ۲۰۰۸، D'Ercole و همکاران در مطالعه مقایسه‌ای دو روش کشت و مولکولی توام (Multiplex PCR) در بیماران دارای پریودونتیت به این نتیجه رسیدند که در جمعیت ۵۲۹ نفره مورد بررسی، با انجام روش مولکولی درصد تشخیص این باکتری‌ها به بیش از دو برابر افزایش می‌یابد (۱۷). در پژوهش صورت پذیرفته مشخص شد که باکتری اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس دارای بیشترین میزان جداسازی در روش کشت و مولکولی بود و پس از آن باکتری

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

پورفیرومونـاس ژنژیـوالیس و درنهایـت بـاکتری پـروتلا اینترمـدیا قـرار داشـتند؛ در حـالی کـه در سـال ۲۰۱۰، Estrela و همکـاران (۱۸) باکتری‌های پریودونتال را به روش مولکولی تـوام بررسـی و جداسـازی کردند و به این نتیجه رسیدند که در میان جمعیت ۲۲ نفره مورد بررسی باکتری پورفیرومونـاس ژنژیوالیس بیشترین میزان جداسازی را دارد. این یافته نشان می‌دهد که درصد و نوع باکتری جدا شده، رابطه مستقیم بـا شرایط زندگی افراد در مناطق مختلف جغرافیایی نیز دارد. همچنـین در سال ۲۰۰۹، Egwari و همکاران (۱۹) در مطالعه بر روی بیماران مبتلا به پریودونتیت در نیجریـه دریافتنـد کـه در جمعیـت ۱۶۲ نفـره مـورد بررسی، ۱۸/۱ درصد دارای پورفیرومونـاس ژنژیوالیس، ۹/۶ درصد دارای پـروتلا اینترمـدیا و ۶/۴ درصـد دارای اگریگـاتی بـاکتر اکتینومایسـتم کـومیتنس مـی‌باشـند. تفـاوت آمـاری معنـی‌داری از نظـر جمعیـت باکتری‌های فوق بین مردان و زنان مشاهده نمی‌شود؛ در حـالی کـه در سال ۲۰۱۰، Rotimi و همکاران (۲۰) در بررسی بـاکتری‌هـای عامـل پریودونتیت در کودکان کویتی با روش مولکولی تـوام بـه ایـن نتیجـه رسیدند که در جمعیت ۲۴۰ نفره مورد بررسی شامل ۱۲۰ دختـر و ۱۲۰ پسر، ۷۷/۱ درصد از نظر این باکتری‌ها مثبت بـوده و بیشـترین میـزان جداسازی مربوط به اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کـومیتنس مـی‌باشـد. همچنین در سال ۲۰۰۶، Tanner و همکاران (۲۱) در بررسی مولکولی با روش مولکولی توام بر روی باکتری‌های زیر لثه‌ایی و زبانی جدا شده در مرحل اولیه پریودونتیت به این نتیجه رسـیدند کـه در جمعیـت ۲۲۱ نفره مورد بررسـی میـزان بـاکتری پورفیرومونـاس ژنژیـوالیس از بقیـه باکتری‌ها بیشتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۶، Daniluk و همکاران (۲۲) در بررسی بر روی نسبت باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی در بیمـاران بـالغ مبتلا به پریودونتیت به این نتیجـه رسـیدند کـه درصـد بـاکتری‌هـای هوازی به بی‌هوازی در جمعیت ۲۱ نفره مورد بررسی ۱ به ۳ می‌باشـد، در حالی که در این مطالعه نسبت باکتری‌های کاپنوفیل بـه بـی‌هـوازی تقریباً ۱ به ۱ می‌باشـد. در سـال ۲۰۰۶، Jardim Junior و همکـاران (۲۳) در مطالعه بر روی باکتری‌های عامل ژنژیویـت و پریودونتیـت بـه این نتیجه دست یافتند که در جمعیت ۱۰۰ نفره مورد بررسی، اگریگاتی باکتراکتینومایسـتم کـومیتنس بیشـترین میـزان جداسـازی را دارد و همچنین در سال ۲۰۰۲، Fouad و همکاران (۲۴) در بررسـی عفونـت دهانی با روش PCR دریافتند که در میان ۲۴ نمونه مورد بررسی میزان اگریگاتی باکتراکتینومایستم کومیتنس بیشترین میزان جداسازی را دارد که با نتایج به دست آمده در این پژوهش هماهنگی دارد. لازم به ذکـر است که روش مولکولی توام برای اولین بار بر روی باکتری‌های مذکور در ایران صورت پذیرفته است. روش کشت روش گلد اسـتاندارد جهـت کشت باکتری‌های فوق می‌باشد و توصیه می‌شود در کنار کار مولکولی به کشت ارگانیسم‌هـای مـذکور نیـز توجـه شـود. بـا اسـتفاده از روش مولکولی توام می‌توان سه باکتری فوق را همزمان شناسـایی کـرد و از هدر رفتن وقت در روش کشت جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علـوم پزشـکی تهـران بـه خاطر حمایت علمی و مالی تشکر می‌نماییم. لازم بـه ذکـر اسـت ایـن مقاله طرح تحقیقاتی مورخ ۹۱/۱/۲۷ به شماره ۱۶۱۶۳ می‌باشد.

منابع:

1- Rakic M, Zelic K, Pavlica D, Hadzimihajlovic M, Milasin J, Milicic B, et al. Association between clinical parameters and the presence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in patients with progressive periodontal lesions. Vojnosanit Pregl. 2010;167(11):898-902.

2- He XS, Shi WY. Oral microbiology: past, present and future. Int J Oral Sci. 2009;1(2):47-58.

3- Ogunsalu C, Daisley H, Akpaka PE. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of pathogens isolated from patients with juvenile periodontitis in Jamaica: a prospective multi-centre study of 15 cases over a 15-year period. West Indian Med J. 2011;60(2):235-9.

4- Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(4):653-70.

5- Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. Periodontol 2000. 2001;26:33-53.

6- Salari MH, Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. J Oral Sci. 2004;46(3):157-61.

7- He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. Clin Oral Investig. 2011. Dec Epub ahead of print.

8- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra-and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. J Clin Periodontol. 2000;27(10):722-32.

9- Urban E, Terhes G, Radnai M, Gorzó I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial

Downloaded from jdm.tums.ac.ir at 7:18 IRST on Wednesday January 24th 2018

molecular genetic method. Anaerobe. 2010;16(3):283-8.

10- Morikawa M, Chiba T, Tomii N, Sato S, Takahashi Y, Konishi K, et al. Comparative analysis of putative periodontopathic bacteria by multiplex polymerase chain reaction. J Periodontal Res. 2008;43(3):268-74.

11- Milicevic R, Brajovic G, Nikolic-Jakoba N, Popovic B, Pavlica D, Leković V, et al. Identification of periodontopathogen microorganisms by PCR technique. Srp Arh Celok Lek. 2008. ;136(9-10):476-80.

12- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5721-32.

13- Amel Y, Bouziane D, Ahmed MLB. Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria. World J Med Sci. 2010;5(1):7-12.

14- 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(2):106-13.

15- Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol 2000. 2004;36:14-26.

16- Owlia P, Salari MH, Saderi H, Kadkhoda Z. Study of relationship between depth of periodontal pockets, anaerobic bacteria and inflammatory cells in periodontitis. Iran J Pub Health. 2000;29(1-4):71-6

17- D'Ercole S, Catamo G, Tripodi D, Piccolomini R. Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. New Microbiol. 2008;31(3):383-91.

18- Estrela CRA, Pimenta FC, Alencar AHG, Ruiz LFN, Estrela C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. J Appl Oral Sci. 2010;18(4):426-31.

19- Egwari LO, Obisesan B, Nwokoye NN. Microbiological status of periodontal diseases in Lagos, Nigeria. West Indian Med J. 2009;58(4):392-7.

20- Rotimi VO, Salako NO, Divia M, Asfour L, Kononen E. Prevalence of periodontal bacteria in saliva of Kuwaiti children at different age groups. J Infect Public Health. 2010;3(2):76-82

21- Tanner ACR, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R, Van Dyke T, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. J Dent Res. 2006;85(4):318-23.

22- Daniluk T, Tokajuk G, Cylwik-Rokicka D, Rozkiewicz D, Zaremba ML, Stokowska W. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. Adv Med Sci. 2006;51 Suppl 1:81-5.

23- Jardim Junior EG, Bosco JMD, Lopes AM, Landucci LF, Jardim ECG, Carneiro SRS. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo. J Appl Oral Sci. 2006;14(3):153-6.

24- Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol. 2002;40(9): 3223-31.