

Evaluation of anaerobic pathogens in periodontitis patients and its relationship with TGF-1 β genomic polymorphism by Tetra arms-PCR method

Noushin Khandan Dezfuli¹, Majid Sadeghpour², Mojgan Sarabi Nobakht³, Elham Estabraghi⁴, Kumarss Amini^{5,*}

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran

2- M.Sc. in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Convergent Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

3- Master of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran

4- Dental Student, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

5* - Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran

Article Info

Article type:
Original Article

Article History:
Received: 22 Jul 2020
Accepted: 30 Apr 2021
Published: 12 Jun 2021

Corresponding Author:
Kumarss Amini

Department of Microbiology,
Faculty of Basic Sciences, Saveh
Branch, Islamic Azad University,
Saveh, Iran

(Email: dr_kumarss_aminia@yahoo.com)

Abstract

Background and Aims: Periodontitis is a common and inflammatory infectious disease that causes damage to the tissues supporting the tooth and consequent tooth loss. Periodontal disease is a multimicrobial and multifactorial disease and important anaerobic bacteria are involved in periodontal infection. TGF-1 β is one of the growth factors and anti-inflammatory cytokines that play a crucial role in the repair of periodontal lesions. The aim of this study was to evaluate Tetra Arms-PCR with high sensitivity and specificity, which can be used to evaluate the genomic polymorphism among oral samples and show the relationship between TGF-1 β and periodontal disease.

Materials and Methods: The present study was a case-control study in the periodontology department of Kerman Dental School. Sampling was done from 100 samples including 50 healthy individuals and 50 patients with microbial periodontal infection. Genotype was analyzed using DNA extracted from the blood of patients by PCR -ARMS-Tetra to determine the relationship between TGF-1 β genomic polymorphism and periodontitis. Statistical analysis was performed with SPSS19 software and one-way ANOVA.

Results: The samples were culture positive, therefore, more than 65% of the isolated bacteria were anaerobic which included: Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Peptostreptococcus anaerobic. The results of Tetra PCR ARMs after sequence frequency were genotype CC allele (25%), CT allele (20%), TT allele (5%). Percentage of control group were CC allele (20%), CT allele (24%), and TT allele (6%). The frequency of C and T alleles in the patient group was 70% and 30%, and in the control group 63% and 37%, respectively with no significant difference between two groups (P=0.83).

Conclusion: According to the results of this study and the application of anaerobic conditions, forced anaerobic bacteria can be isolated from clinical specimens of oral infections and by Tetra Arms-PCR no significant relationship between TGF-1 β genomic polymorphism and periodontitis was observed. In addition, there was no significant difference in the frequency of alleles and genotypes between the control and patient groups.

Keywords: Periodontal, Anaerobic pathogens, Tetra arms-polymerase chain reaction

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2021;34:5

Cite this article as: Khandan Dezfuli N, Sadeghpour M, Sarabi Nobakht M, Estabraghi E, Amini K. Evaluation of anaerobic pathogens in periodontitis patients and its relationship with TGF-1 β genomic polymorphism by Tetra arms-PCR method. J Dent Med-TUMS. 2021;34:5.



بررسی پاتوژن‌های بی‌هوازی بیماران پریدونتیت و ارتباط آن با پلی مورفیسم ژنومی Tetra Arms-PCR (فاکتور انتقال رشد) با روش

نوشین خندان دزفولی^۱، مجید صادق پور^۲، مژگان سرابی نوبخت^۳، الهام استبرقی^۴، کیومرث امینی^{۵*}

- ۱- استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران
 ۲- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی بیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
 ۳- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران
 ۴- دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
 ۵* - دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله: مقاله پژوهشی</p> <p>وصول: ۹۹/۰۶/۱۷ اصلاح نهایی: ۴۰۰/۰۳/۱۵ تأیید چاپ: ۴۰۰/۰۳/۲۲</p> <p>نویسنده مسوول: کیومرث امینی</p> <p>گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com)</p>	<p>زمینه و هدف: پریدونتیت یک بیماری عفونی شایع و التهابی است که باعث تخریب بافت‌های نگهدارنده دندان و متعاقب آن از دست رفتن دندان می‌شود. پریدونتال، بیماری چند میکروبی و چند عاملی بوده و باکتری‌های مهم بی‌هوازی در عفونت پریدونتیت نقش دارند. TGF-1β یکی از فاکتورهای رشد و سایتوکاین ضد التهابی است که در ترمیم ضایعات پریدونتال نقش تعیین کننده دارد. هدف از این مطالعه استفاده از روش Tetra Arms-PCR با حساسیت و ویژگی بالا برای بررسی پلی مورفیسم ژنومی در بین نمونه‌های دهانی و نشان دادن ارتباط بین TGF-1β و بیماری پریدونتال بود.</p> <p>روش بررسی: مطالعه حاضر به صورت موردی شاهدی در بخش پریدونتولوژی دانشکده دندانپزشکی کرمان انجام شد. از بین ۱۰۰ نفر نمونه شامل ۵۰ نفر سالم و ۵۰ نفر مبتلا به عفونت پریدونتال میکروبی نمونه گیری صورت گرفت. ژنوتایپ با استفاده از DNA استخراج شده از خون افراد بیمار با روش Tetra Arms-PCR بررسی شد تا ارتباط بین پلی مورفیسم ژنومی TGF-1β و بیماری پریدونتیت مشخص گردد. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS19 و با روش ANOVA یک طرفه (one way Anova) انجام شد.</p> <p>یافته‌ها: تمامی نمونه‌ها کشت مثبت بوده و بیش از ۶۵٪ از باکتری‌های جدا شده بی‌هوازی مطلق بود. باکتری‌های حاصله شامل: پورفیروموناس، فوزوباکتریوم، پیتواسترپتوکوک، پره ووتلا بی‌هوازی بود. نتایج حاصل از Tetra Arms-PCR پس از انجام سکانسینگ فراوانی ژنوتیپ CC (۲۵٪)، CT (۲۰٪)، TT (۵٪) بود. درصد گروه کنترل (۲۰٪)، CT (۲۴٪)، TT (۶٪) و فراوانی آلل های C و T در گروه بیمار ۷۰٪ و ۳۰٪ در گروه کنترل ۶۳٪ و ۳۷٪ بود که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه نبود (P=۰/۸۳).</p> <p>نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه و بکارگیری شرایط بی‌هوازی، باکتری‌های بی‌هوازی اجباری را می‌توان از نمونه‌های بالینی عفونت‌های حفره دهان جدا کرد و با انجام Tetra Arms-PCR مشاهده گردید که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم ژنومی TGF-1β و بیماری پریدونتیت وجود نداشت و تفاوت معنی‌داری نیز در فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها در بین دو گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد.</p> <p>کلید واژه‌ها: پریدونتال، پاتوژن‌های بی‌هوازی، تترا آرمز بی سی آر</p> <p>مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران دوره ۳۴، مقاله ۵، ۱۴۰۰</p>

مقدمه

بیماری پریدونتال (پریدونتیت) از بیماری‌های لته است که سبب بروز التهابی بافت‌های حمایت کننده دندان است و توسط میکروارگانیسم‌های خاص یا گروهی از میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود و با تخریب وسیع لیگامان پریدونتال و استخوان آلوئولار به همراه تشکیل پاکت پریدونتال دندان، تحلیل لته و یا هر دو مشخص می‌شود. از جمله میکروارگانیسم‌های مهمی که در فرآیند ایجاد تخریب نقش دارند باکتری‌های بی‌هوازی دهانی هستند. این بیماری عفونی شایع و التهابی که باعث تخریب بافت‌های نگهدارنده دندان و متعاقب آن شل شدن و از دست رفتن دندان می‌شود (۱،۲).

این بیماری مهم با حالات مختلف بالینی در بین بیماری‌های دهان و دندان از شیوع بالایی برخوردار است (۳). عفونت پریدونتال به طرز قابل توجهی باعث افزایش خطر ابتلا به بعضی از بیماری‌های سیستمیک مانند بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، زایمان زودرس و اختلالات تنفسی می‌گردد (۴). باکتری‌های پلاک و جرم دندان هم به طور مستقیم و هم غیر مستقیم در روند تخریب بافت‌های پریدونتال نقش دارند. اثر مستقیم به صورت ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک و بروز عوامل سرکوب کننده ایمنی می‌باشد ولی در اثر غیر مستقیم عوامل پاتوژن میکروباها مانند لیوپلی ساکارید باعث تحریک پاسخ ایمنی میزبان شده که منجر به تحریک سنتز سیتوکین‌های پیش التهابی، تجزیه بافت همبند و تحلیل استخوان می‌شود (۵).

سیتوکین‌ها میانجی‌های پیتیدی می‌باشند که در تنظیم پاسخ‌های ایمنولوژیکی، التهابی، سیستمیک و پاسخ‌های ترمیمی در مقابل عوامل مهاجم به صورت تحریک تکثیر و تمایز سلول‌ها و یا به صورت ممانعت از تکثیر و تمایز سلول‌ها دخالت می‌کنند (۶). باکتری‌های موجود در محیط دهان، بافت پیرامون دندان را عفونی می‌کنند و موجب التهاب آن می‌شوند. پورفایروموناس جینجیوالیس، پروتلا ایترمدیا، پروتلا ملانینو جینیکا، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم از این باکتری‌ها می‌باشند که با روش‌های بیوشیمیایی قابل شناسایی و تشخیص هستند (۷).

عفونت و التهاب ایجاد شده در ادامه منجر به بیماری پریدونتال می‌شود. باکتری‌هایی که به دلیل عدم رعایت بهداشت دهان و دندان برای مدتی طولانی بر روی دندان‌ها باقی می‌مانند، منجر به تشکیل لایه‌ای به نام پلاک دندان می‌شوند که با گذشت زمان به لایه‌ای سخت

به نام جرم تبدیل می‌شوند (۸). این تشکیلات به تدریج به فضای زیر لته گسترش می‌یابند که پاکسازی آن‌ها از طریق روش‌های معمولی بهداشتی دشوار است و باید توسط دندانپزشک برداشته شوند تا از بروز و پیشرفت بیماری پریدونتال پیشگیری شود (۹).

تورم و قرمزی لته، خونریزی و احساس درد لته در اثر لمس، درد لته هنگام عمل جویدن، لقی دندان، حساسیت دندان، بوی نامطبوع دهان یا هالیتوزیس، تحلیل لته و نمایان شدن بخشی از تاج و ریشه که باید به طور معمول توسط لته پوشانده شده است، احساس تغییر در جفت شدن دندان‌های بالا و پایین، احساس تغییر در جفت شدن پروتزهای دندان از علایم این بیماری هستند. برخی عوامل می‌توانند خطر بروز بیماری پریدونتال را افزایش دهند از جمله: کشیدن سیگار، دیابت، عدم رعایت بهداشت دهان و دندان، استرس، وراثت، بی‌نظمی دندان‌ها، اختلالات ایمنی مانند ایدز، نقص در پرکردن دندان، خشکی دهان که دلایل متعدد دارد از جمله مصرف برخی داروها، بریج‌های دندان نامناسب و تغییرات هورمونی در زنان مانند حاملگی یا مصرف قرص‌های ضد بارداری است (۱۰،۱۱).

بیماری‌های پریدونتال، بیماری‌های چند میکروبی و چند عاملی هستند و فاکتورهای زیادی در میزبان در تعیین حساسیت افراد به بیماری نقش دارند. ارتباط بین میکروباها پریدونتال و میزبان معمولاً خوش‌خیم است، اما زمانی که گونه‌های خاص باکتریایی در فضای‌های زیر لته‌ای بیش از حد رشد می‌کنند، ممکن است سبب التهاب و تخریب پریدونتال همراه با از دست رفتن اتصال دندان و از دست رفتن استخوان شود (۱۲).

اکثر پاتوژن‌های پریدونتال عفونت واقعی پریدونتال را نشان می‌دهند، برخی گونه‌های باکتریایی که عضو فلور هم سفره در محیط پریدونتال هستند (اکتینوماست‌ها، گونه‌های خاص استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس) می‌توانند عفونت‌های فرصت‌طلبی را در صورت اختلال در اکوسیستم ایجاد کنند (۱۳).

پریدونتیت موضعی به شدت با حضور اکتینوباسیلوس (هموفیلوس) اکتینوماستوما کامیتانس و کاپنوسیتوفاگا و ایکنلا کورودنس مرتبط است. دیگر پاتوژن‌های پریدونتال مورد تردید، ترپونما دنتیکولا، ترپونما فورسیتیا، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، پروتلا ایترمدیا، کمپیلوباکتر رکتوس، ایکنلا کورودنس، پیتواسترپتوکوکوس میکروس و گونه سلنوموناس

دارد. با نظر به اینکه سایتوکاین‌ها مانند $TGF-1\beta$ در بافت پرپودنشیوم (Periodontium)، جزء سیستم ایمنی بوده در کنترل عملکرد سلولی در هر دو حالت سلامت و بیماری نقش کلیدی دارند. حضور و غلظت آن‌ها در مایع شیار لثه‌ای می‌تواند به عنوان شاخصی برای تشخیص بیمارهای پرپودنتال مورد استفاده قرار گیرد، بنابراین امروزه نقطه عطف بسیاری از تحقیقات قرار گرفته‌اند (۱۷، ۱۸).

سطح $TGF-1\beta$ در GCF (Human Gingival Crevicular Fluid) به دنبال روند ایجاد بیماری پرپودنتال مؤثر و با آن رابطه مستقیم دارد. هدف از این مطالعه، شناسایی پلی مورفیسم ژنی $TGF-1\beta$ در عفونت پاتوژنی بی‌هواری عامل پرپودنتیت با روش Tertra-Arnes-PCR بود.

روش بررسی

جمع آوری نمونه: تحقیق حاضر به صورت مورد-شاهدی و با رضایتنامه کتبی آگاهانه در بخش پرپودنتولوژی دانشکده دندانپزشکی کرمان در محدوده زمانی بهار ۹۸ تا زمستان ۹۸ انجام گرفت. افراد مورد مطالعه با در نظر گرفتن معیار ورود و خروج انتخاب شدند به این ترتیب که بیمارانی که بدون علائم با سایر بیماری‌های سیستمیک بودند و حداقل در ۶ ماه گذشته آنتی بیوتیک مصرف ننموده بودند انتخاب شدند. همچنین بیمارانی که در ناحیه لثه یک التهاب با عمق ۶ میلی متر و تورم با اندکس ۳ داشتند انتخاب شدند. نمونه برداری از این افراد با برداشت ناحیه‌ای از پلاک فوق و زیرلثه‌ای در ظروف مخصوص نمونه گیری انجام شد. تشخیص بیماری پرپودنتیت مزمن توسط پرپودنتولوژیست و بر اساس معاینات کلینیکی، تاریخچه پزشکی و دندانپزشکی بررسی میزان لق بودن دندان، خونریزی در حین پروب کردن، میزان عمق پروب و استفاده از رادیوگرافی‌های دندان به عمل آمد. تعداد نمونه تحقیق ۱۰۰ نفر در نظر گرفته شد که شامل ۵۰ نفر سالم (زن + مرد) به عنوان کنترل و ۵۰ نفر بیماران مبتلا به عفونت پرپودنتال میکروبی (زن + مرد) بودند. در جدول ۱ فراوانی جنسیت افراد کنترل و بیماری پرپودنتال نشان داده شده است.

هستند. شواهد نسبتاً قوی برای دیگر باکتری‌های ایزوله شده از میکروبیوتای زیرلثه‌ای مانند پروتلا اینترمدیا، پروتلا نیگرسنس، کمپیلوباکتر رکتوس، پتپتواسترپتوکوکوس میکروس، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، یوباکتریوم نودانوم و اسپیروکت‌های مختلف مثل ترپونما دنتیکولا جمع آوری شده است. اگرچه نقش اتیولوژی آن‌ها کمتر شناخته شده است. بنابراین بیماری پرپودنتال ممکن است به عنوان عفونت چند میکروبی در نظر گرفته شود. میکروب‌های پلاک و جرم هم به صورت مستقیم و هم غیرمستقیم در سلامت بافت‌های پرپودنتال نقش دارند. ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک و بروز عوامل سرکوب کننده ایمنی اثر مستقیم آن‌ها است (۱۳، ۱۴).

$TGF-1\beta$ (Transforming growth factor beta) یکی از فاکتورهای رشد ضد التهابی است که تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند: $IL-1$ و $IL-12$ را مهار، اثر میتوژنیک $IL-2$ بر سلول‌های B و T را خنثی و چسبیدگی لکوسیت‌ها به سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند (۱۵).

فاکتور رشد تغییردهنده بتا (Transforming growth factor beta) یک سیتوکین چندکاره است که به فاکتورهای رشد تغییردهنده تعلق دارد و ۴ ایزوفرم و چندین پروتئین نشانه گذاری یافته دیگر را شامل می‌شود و توسط گلبول سفید ترشح می‌شوند. فاکتور رشد تغییر دهنده بتا پس از فعال شدن، با فاکتورهای دیگر ترکیب شده و یک کمپلکس سرین/ترئونین کیناز تشکیل می‌دهد که با گیرنده فاکتور رشد تغییر دهنده بتا ترکیب شده که دو زیر واحد نوع ۱ و نوع ۲ دارد. ماکروفاژها هم این مولکول را ترشح می‌کنند. یکی از کارهای اصلی این پروتئین، تنظیم فرایندهای التهابی، به‌ویژه در روده است. علاوه بر این، تمایز و تنظیم لنفوسیت‌های T و تمایز یاخته بنیادی از دیگر کارهای این پروتئین است.

علاوه بر این $TGF-1\beta$ خواص مکانیکی و رسوب ماتریکس استخوانی را کنترل نموده بر پرولپراسیون سلول‌های لیگامان پرپودنتال و فیبروبلاست‌های لثه‌ای مؤثر است (۱۶).

بنابراین $TGF-1\beta$ در ترمیم ضایعات پرپودنتال نقش تعیین کننده‌ای

جدول ۱- فراوانی افراد کنترل سالم و بیماران پرودنتال بر حسب جنسیت

گروه‌های مورد نظر	فراوانی مراجعین	درصد فراوانی
مرد بیمار	۲۸	۵۰٪
زن بیمار	۲۲	
مرد سالم	۲۷	۵۰٪
زن سالم	۲۳	

بی‌هوازی، یک بار دیگر به دو طریق بی‌هوازی اجباری و هوازی، کشت مجدد انجام شد تا مشخص شود که آیا باکتری ایزوله شده بی‌هوازی اجباری است و یا هوازی بی‌هوازی اختیاری. با استفاده از شکل کلنی، واکنش گرم، مورفولوژی، وجود یا عدم وجود اسپور هیت اولیه ارگانسیم‌های جدا شده مشخص گردید. با انجام تست مقاومت به صفراوی ۲۰٪ تخمیر فندهای مورد نظر و الگوهای حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک‌های تشخیصی (وانکومايسين، کانامایسین، کلیستین) با توجه به دستورالعمل‌های CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) سال ۲۰۱۸ انجام شد (۱۹).

انواع باکتری‌های باسیلی شکل گرم منفی بی‌هوازی اجباری مشخص شد و با استفاده از شکل کلنی، واکنش گرم، مورفولوژی و تست SPS کوکسی‌های گرم مثبت بی‌هوازی اجباری تعیین هیت شد. رشد روی محیط کشت EYA و بررسی تست‌های ناگلر و تولید لیپاز، خاصیت پروتئولیتیک، ساکارولایتیک، ایجاد گاز، تخمیر توفانی، تولید اسپور برای تعیین هیت باکتری‌های بی‌هوازی میله‌ای شکل گرم مثبت، بی‌هوازی‌های میله‌ای شکل گرم مثبت، کوکسی‌های بی‌هوازی و باسیل‌های گرم منفی یا دوکی شکل، بررسی شد (۱۹).

بررسی پلی مورفیسم ژنومی $TGF-1\beta$ در بیماران مبتلا به پرودنتیت

تکنیک Tetra Arms-PCR یک روش مبتنی بر PCR برای تشخیص وجود پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتید (SNP) در ژنوم بوده و یکی از کاربردهای بسیار مهم آن (Tetra Arms-PCR) در تشخیص جهش‌ها است.

استخراج DNA: از بیماران مبتلا به پرودنتیت نمونه خون جمع آوری و سپس با استفاده از کیت‌های استخراج (Sinacolon

حجم نمونه براساس فرمول محاسبه حجم نمونه فرمول کوکران زیر محاسبه شد. در این محاسبه با سطح خطای ۵ درصد، تعداد ۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه گروه کنترل تخمین زده شد.

$$n = \frac{\frac{z^2 pq}{d^2}}{1 + \frac{1}{N} \left[\frac{z^2 pq}{d^2} - 1 \right]}$$

n = تعداد نمونه

N = فراوانی جمعیت

P = گروهی از جمعیت

q = ۱ - p

z = ۱/۹۶

d = (۰/۰۵) میزان خطا

با روش رنگ آمیزی گرم، وجود میکروارگانسیم و عناصر سلولی، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. به منظور مقایسه میزان کارایی سیستم‌های ایجاد کننده شرایط محیط بی‌هوازی کامل، نمونه‌ها در چندین پلیت محیط کشت (بلاد آگار و شکلات آگار تهیه شده از شرکت‌های مدیا کشور هندوستان) تلقیح شد و در سیستم کشت بی‌هوازی و گاز پک در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. پلیت‌های انکوبه شده در محیط بی‌هوازی پس از ۴۸ ساعت و پلیت‌های انکوبه شده برای هوازی بی‌هوازی پس از ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. از کیت تجاری API نیز می‌توان جهت تشخیص استفاده کرد. با توجه به اینکه کیت تجاری API نیازمند درخواست ثبت سفارش بود و هزینه اقتصادی بیشتری را تحمیل می‌کرد لذا از بکارگیری آن صرف‌نظر گردید. در صورت رشد باکتری و مشاهده کلنی در روی محیط‌های

DNA انجام شد. بعد از آن ردیابی ژن‌های افراد مبتلا به پریدنتیت به روش Tetra Arms-PCR با حجم نهایی ۲۰ μl شامل ۱۰ میکرولیتر PCR master mix (شرکت سیناکولون)، ۱ میکرولیتر از هر دو نمونه پرایمرهای (جدول ۲) فوروارد و ریورز، DNA الگو ۳ میکرولیتر و آب ۳ میکرولیتر انجام شد (۲۰).
واکنش Tetra Arms-PCR: مراحل دمایی- زمانی واکنش Tetra Arms-PCR مطابق با جدول ۳ انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت (جدول ۴). الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی آگارز ۱٪/۵ انجام شد.

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در تکنیک Tetra arms PCR در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر (3-5)	طول نوکلئوتید
TGFβ1 SNPs (F)	AGTAAATGAAGTGGGGTCGCAGGGGTGTTG	۲۹۵ bp
TGFβ1 SNPs (R)	AAAGAGGACCAGGCGGAGAAGGCTTAAT	۲۹۵ bp

جدول ۳- مقادیر مواد مورد استفاده برای انجام مراحل Tetra Arms-PCR

مقدار ترکیبات به میکرولیتر (μl)	مواد مورد نیاز
۴/۶	آب مقطر دوبار تقطیر
۰/۸	پرایمر چپ
۰/۸	پرایمر راست
۴	DNA
۱۰	Master mix
۲۵	حجم نهایی

جدول ۴- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۱۸۰	۱
واسرشت سازی	۹۵	۳۰	-
اتصال آغازگر	۶۰	۴۰	-
بازآرایی (گسترش پلیمرز)	۷۲	۶۰	۳۵
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	-

نیز نرم افزار Microsoft Office Excel ویرایش ۲۲ جهت بررسی و رسم نمودارها استفاده شد.

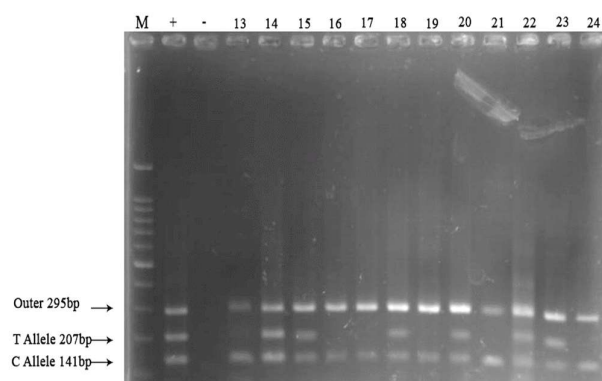
الکتروفورز محصول: از محلول ژل آگارز ۱/۵٪ جهت الکتروفورز محصولات تست مولکولی استفاده شد. در این مرحله نمونه‌های حاصل از واکنش Tetra Arms-PCR و DNA Ladder را در چاهک‌های ژل تخلیه شدند. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در داخل محلول اتیدیوم برمایید به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه به منظور رنگ‌آمیزی غوطه‌ور شد. سپس ژل روی پوشش پلاستیکی تحت اشعه (UV) در دستگاه لومیناتور قرار گرفت. اتیدیوم بروماید به DNA باند شد و هنگامی که ژل در دستگاه تابش تحت تابش اشعه ماورا بنفش (UV) قرار گرفت، باندها به صورت نارنجی درخشان تحت پرتو در دستگاه ژل داکت بیورد (Bio-Rad Gel Doc) مشاهده شد. در این مطالعه جهت تجزیه و تحلیل آماری از روش ANOVA یک طرفه (one way Anova) در نرم افزار SPSS19 و

یافته‌ها

با توجه به بررسی‌های انجام شده از ۱۰۰ نمونه دهانی، در تمامی نمونه‌ها حضور باکتری‌های بی‌هوازی مشاهده شد. انواع مختلف باکتری‌های بی‌هوازی اجباری، هوازی و هوازی بی‌هوازی اختیاری جدا شده و فراوانی مطلق و نسبی آن‌ها در جدول (۵) بیان شد. در مجموع ۲۷ مورد (۳۷٪) از نمونه‌های کشت داده شده دارای نتیجه کشت تک میکروبی (مونومیکروبیال) و مجموع ۴۵ مورد (۶۳٪) نیز چندمیکروبی و در ۶۴٪ از نمونه‌ها باکتری‌های بی‌هوازی جدا گردید.

جدول ۵- نام جنس، گونه و فراوانی مطلق و نسبی انواع مختلف باکتری‌های جدا شده

نمونه‌های چند میکروبی		نمونه‌های تک میکروبی		باکتری‌های جدا شده		
درصد	تعداد	درصد	تعداد	نوع گرم	جنس گونه	ردیف
۲۰	۹	۱۱	۳	منفی	پرهوتلا ملانینوزینکا	۱
۱۱	۵	۷	۲	منفی	پرهوتلا اورالیس	۲
۶	۳	۳	۱	منفی	پروفیروموناتس آسکارولیتیکا	۳
۶	۳	۳	۱	منفی	پروفایروموناتس نژزیوالیس	۴
۱۵	۷	۱۸	۵	منفی	فوزوباکتریوم نوکلئاتوم	۵
۴	۲	-	-	منفی	فوزوباکتریوم نکروفروم	۶
۴	۲	۳	۱	منفی	پسودوموناتس آتروژینوزا	۷
۴	۲	۱۱	۳	منفی	اشریشیاکلی	۸
۲	۱	۳	۱	مثبت	اکتینومایست ایسرایلی	۹
۲	۱	۳	۱	مثبت	پیتواسترپتوکوک انائروبیوس	۱۰
۶	۳	۷	۲	مثبت	استافیلوکوک اورئوس	۱۱
۶	۳	۷	۲	مثبت	استافیلوکوک کواگولازمنفی	۱۲
۴	۲	۳	۱	مثبت	استرپتوکوک گروه A	۱۳
۶	۳	۷	۲	مثبت	استرپتوکوک ویریدانس	۱۴
-	-	۷	۲	مثبت	استرپتوکوک پنومونیه	۱۵
۶۳٪	۴۵	۳۷٪	۲۷	جمع کل		



شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های مثبت از نمونه ۱۳ تا ۲۴، به ترتیب از چپ به راست DNA Ladder: + کنترل مثبت (آلل T و آلل C دارای فاکتور مورد تأیید)، - کنترل منفی (آب مقطر) Outer: ۲۹۵ bp - T allele: ۲۰۷ bp - C allele: ۱۴۱ bp

نتایج ژل آگارز: ظهور دو باند نشانه جهش‌های هموزیگوت و ظهور سه باند نشانه جهش‌های هتروزیگوت می‌باشد. هیچ کدام از جهش‌های فوق، در جمعیت بیمار مشاهده نگردید. بنابراین با توجه به نتایج ژل آگارز و مشاهده باندها در جمعیت کنترل و بیمار می‌توان اینگونه نتیجه گیری کرد که ارتباط معنی‌داری بین بیماری پریودنتیت و TGF-1 β وجود ندارد.

پس از پایان تکنیک Tetra Arms-PCR و محصول آن، پس از مرحله الکتروفورز و مشاهده باندها توجه به این نکته که در هر ژنوتیپ دارای دو آلل است. بنابراین در موجودات دیپلوئید برای هر ژن ممکن است سه حالت پیش بیاید، ژنوتیپ دارای دو آلل موتانت (هموزیگوت موتانت)، ژنوتیپ دارای دو آلل سالم (هموزیگوت وحشی) و ژنوتیپ دارای یک آلل سالم و یک آلل جهش یافته (هتروزیگوت) است (شکل ۱).

جدول ۶- درصد فراوانی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هوازی و بی هوازی

P-Value	فراوانی باکتری‌های گرم مثبت بی هوازی	فراوانی باکتری‌های گرم منفی بی هوازی	فراوانی باکتری‌های گرم مثبت	فراوانی باکتری‌های گرم منفی	نمونه‌ها
۰/۸۳	۲۱	۳۴	۱۲	۴	نمونه بیمار
	%۴۲	%۶۸	%۲۴	%۸	۵۰
۰/۸۳	۲۰	۴۱	۹	۰	نمونه کنترل
	%۴۰	%۸۲	%۱۸	%۰	۵۰
	۴۲	۷۵	۲۱	۴	تعداد کل ۱۰۰

جدول ۷- نتایج فراوانی آلل‌ها در جمعیت کنترل و نتایج فراوانی ژنوتیپ در جمعیت کنترل

آلل	C آلل	T آلل	کل	
تعداد	۶۴	۳۶	۱۰۰	
فراوانی	۰/۶۴	۰/۳۶	۱	
ژنوتیپ	C/C آلل	C/T آلل	T/T آلل	کل
تعداد	۲۰	۲۴	۶	۵۰

جدول ۸- فراوانی ژنوتیپ و آنالیز ژنومی آلل‌ها در جمعیت بیماران

آلل	C آلل	T آلل	کل	
تعداد	۷۰	۳۰	۱۰۰	
فراوانی	۰/۷۰	۰/۳۰	۱	
ژنوتیپ	C/C	C/T	T/T	کل
تعداد	۲۵	۲۰	۵	۵۰

باکتریایی که عضو فلور هم‌سفره در محیط پریودنتال هستند (اکتینومایست‌ها، گونه‌های خاص استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس) می‌توانند عفونت‌های فرصت‌طلبی را در صورت اختلال در اکوسیستم ایجاد کنند (۲۲).

در ایجاد عفونت‌های حفره دهان و عفونت‌های اندام‌های مجاور آن از قبیل عفونت‌های مزمن سینوزیت، آبسه‌های پری تانسیلا و تمامی عفونت‌های عمق فضای گردنی و عفونت‌های ادونتوژنیک دخالت باکتری‌های بی‌هوازی اجباری بسیار شایع می‌باشد (۲۳).

Ghanbari و همکاران (۲۴) در سال ۱۳۹۵ مطالعه‌ای به منظور بررسی مولکولی آلودگی به کمپیلوباکترکوتوس در ضایعات پریودنتال بیماران مراجعه کننده به کلینیک دندانپزشکی دانشگاه تهران انجام دادند. نمونه‌گیری از ۴۰ نفر از بیماران انجام شد. یافته‌های این تحقیق ضمن تأیید حضور کمپیلوباکترکوتوس در درصد قابل توجهی از نمونه‌های حاصل از موارد پریودنتیت نشان داد که از روش PCR می‌توان به عنوان روشی سریع و آسان در تشخیص این باکتری در نمونه‌های بالینی بهره برد.

در پژوهش حاضر در مجموع، باکتری‌هایی از جنس استافیلوکوک، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آکروموباکتر، Granulicatella و Gordonia, adiacens و Kocuria rhizophila در بیماری‌های پریودنتال یافت شد که بعضی از این باکتری‌ها در پژوهش‌های دیگر نیز دیده شده‌اند و برخی نیز برای بار نخستین در بیماری‌های پریودنتال گزارش شده‌اند. همچنین در این پژوهش روش PCR و سکوتینس به عنوان روشی بسیار دقیق، سریع و مطمئن به منظور شناسایی هرچه سریع‌تر و دقیق‌تر جنس و سویه باکتری‌های دخیل در بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های پریودنتال شناخته شد.

بیماری پریودنتال دارای علت‌های زیادی از قبیل میکروارگانیزم‌های زیر لثه‌ای، میانجی‌های تخریبی ناشی از میکروارگانیزم‌ها و میزبان می‌باشند که این‌ها در بزاقی و مایع شیار لثه‌ای و بافت لثه‌ای قابل مشاهده است. بیماری پریودنتال به طور معمول بر اساس پارامترهای کلینیکی نظیر تحلیل استخوانی که در رادیوگرافی دیده می‌شود و تشخیص PD (periodontal)، CAL (clinical loss of attachment)، BOP (bleeding on probing) داده و ثبت می‌گردد (۲۵). لازم به ذکر است که منشاء عفونت‌های

بررسی فراوانی آل‌ها در جمعیت بیمار و کنترل: در جدول ۶ فراوانی ژنوتیپ‌ها و آل‌های پلی مورفیسم ژنومی TGF-1β در گروه کنترل و بیمار با هم مقایسه شد. یافته‌های حاصل از Tetra Arms-PCR نشان داد فراوانی ژنوتیپ CC, TT, CT به ترتیب ۲۵٪، ۲۰٪ و ۵٪، درصد گروه کنترل ۶٪، ۲۰٪ و ۲۴٪، فراوانی آل C و T در گروه بیمار ۳۰٪ و ۷۰٪ و در گروه کنترل ۶۴٪ و ۳۶٪ بود که تفاوت معنی‌داری در توزیع ژنوتیپ‌ها بین دو گروه مشاهده نشد. فراوانی آل T در گروه بیمار ۳۰٪ و در گروه کنترل ۳۶٪ بود، لذا ارتباط معنی‌داری بین بیماری پریودنتیت و آل T مشاهده نشد. فراوانی آل C در گروه بیمار ۷۰٪ و در گروه کنترل ۶۴٪ بود که تفاوت معنی‌داری از نظر آل C بین دو گروه مشاهده نشد (جدول ۷ و ۸).

بحث و نتیجه گیری

تحقیقات مختلف دندانپزشکی در مورد چگونگی وضعیت سلامت دهان و دندان بر کیفیت زندگی، از طریق اثر گذاری بر سلامت عمومی فردی و اجتماعی نقش دارد. درد، ناراحتی، بی‌خوابی‌های شبانه همگی دلایلی است که بر کیفیت زندگی تأثیر دارد. بیماری پریودنتال یک بیماری التهابی مزمن هستند که بر اثر تداخل بین میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا و سیستم دفاعی میزبان ایجاد می‌شود. تشخیص بیماری پریودنتال بر پایه یافته‌های کلینیکی و رادیوگرافی استوار است. این روش‌ها گذشته نگر و غیر حساس می‌باشند زیرا زمانی توانایی تشخیص دارند که حداقل چند میلی‌متر ارتباط بین بافت و دندان تخریب شده و از بین رفته باشد. با بررسی انواع نمونه‌های بالینی به ویژه از نمونه‌های تهیه شده عفونت‌های بسته مثل آبسه‌ها و غیره در عفونت‌های حفره دهان - بافت‌ها و اندام‌های درون آن، میکروارگانیزم‌ها را جدا و تعیین هویت نمود (۲۱).

در کشور ما از بررسی‌های تعیین حساسیت دارویی بر باکتری‌های بی‌هوازی دهانی مطالعه‌ای گزارش نشده است، لذا بایستی این امر یکی از الویت‌های کارهای میکروب شناسی تلقی شود. اکثر پاتوژن‌های پریودنتال بی‌هوازی هستند، اما بیوفیلیم می‌تواند زیستگاه هوازی‌های اختیاری، کپنوفیل‌ها و میکروآئروفیل‌ها باشد و تعداد آن‌ها بستگی به محیط بیوفیلیم ایجاد شده و پاکت پریودنتال دارد. اکثر پاتوژن‌های پریودنتال عفونت واقعی پریودنتال را نشان می‌دهند، برخی گونه‌های

سطوح TGF-1 β در لثه، مایع چرکی و مایع لثه‌ای همراه با التهاب پریودنتال در انسان و سگ پرداختند. این داده‌ها نشان می‌دهد که TGF-1 β ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز و تشخیص بیماری پریودنتال داشته باشد و فعالیت‌های آن را می‌توان در مدل حیوانی مورد بررسی قرار داد.

Wright و همکاران (۲۷) در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که در صورت القای فرم تجربی ژنوتیپ می‌توان شاهد افزایش غلظت TGF-1 β در مایع شیار لثه بود. نتایج مطالعه نشان داد که TGF-1 β ممکن است به تنظیمات التهابی و رونویسی در طی بیماری‌های پریودنتال کمک کند. بنابراین، در طی این مطالعه نشان داد که کاهش غلظت TGF-1 β در ضایعات فعال پریودنتیت نقش کلیدی دارد. بنابراین شناسایی بیومارکری که در فعالیت بیماری، پیش‌آگهی و پاسخ به درمان مؤثرند مهم بوده و به پزشکان اجازه می‌دهد که به موقع به شناسایی دقیق بیماران، کسانی که در معرض خطر هستند و پیش‌بینی سریع بیماری بپردازند.

Gürkan و همکاران (۲۸) در سال ۲۰۰۶ به بررسی TGF-1 β در مایع شیار لثه‌ای در بیماری‌های پریودنتیت پرداختند و نتایج این مطالعه نشان دهنده سهم TGF-1 β در پاتوژنز پریودنتیت مزمن و تهاجمی پیشرفته است. بنابراین، TGF-1 β ممکن است یکی از اجزای تشکیل دهنده واکنش بیماران مبتلا به پریودنتیت همراه با سایر میانجیگرهای اصلی التهاب باشد.

Heidari و همکاران (۲۹) در سال ۲۰۱۵ تخریب بافت لثه‌ای و ارتباط آن پلی مورفیسم ژنومی TGF-1 β در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن را مطالعه کردند. نتایج مطالعه نشان داد که TGF-1 β C/T (-509) به شدت با پارامترهای کمی از ترکیبات بافت همبند بین دندان‌های در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن (CP) ارتباط دارد. برای آلل‌های نادر کم بودن حجم نمونه بر روی ارتباط علائم کلینیکی و ژنوتیپ‌ها تأثیر می‌گذارد، پس در گام اول می‌توان با افزایش حجم نمونه به صحت ارتباط آلل‌ها و ابتلا به بیماری پریودنتیت پی برد. به نظر می‌رسد در این مطالعه بررسی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در TGF-1 β در جهت روشن شدن زمینه ژنتیکی پریودنتیت مزمن کافی نبوده و نیاز به بررسی پلی مورفیسم‌های دیگر این ژن و ژن‌های دیگر می‌باشد.

اندام‌های مجاور حفره دهان نیز ارگان‌های حفره دهان است. بی‌هوازی‌ها حداقل در ۳۰ تا ۵۰ درصد از موارد عفونت‌های مزمن گوش میانی دیده می‌شوند.

علاوه بر باکتری‌های بی‌هوازی ممکن است باکتری‌های دیگری از جمله استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناس آئروژینوزا و کلی فرم‌ها نیز از نمونه‌های این قسمت به دست آید. از عواقب عمده این عفونت‌ها می‌توان به گسترش عامل عفونت به سیستم اعصاب مرکزی و ترومبوفلیت سپتیک سینوس ورید جانبی یا سیاهرگ گردنی اشاره نمود.

در صورتی که نمونه‌های بالینی به صورت مناسبی تهیه شده باشند می‌توان باکتری‌های بی‌هوازی اجباری جدا نمود که در این تحقیق این امر محقق شده است. بی‌هوازی‌هایی که از این نمونه‌ها جدا می‌شوند می‌توان به پروهوتلا، پورفیروموناس، فوزوباکتریوم، پیتواسترپتوکوک و گونه‌های جنس باکترئید از جمله به باکترئید فراژیلیس اشاره نمود. به غیر از بی‌هوازی‌ها طیف متنوعی از استرپتوکوک‌ها، استاف اورئوس و هموفیلوس آفلوانزا غیر تایپ b ممکن است حضور داشته باشند. در مطالعه حال حاضر اختلاف آماری معنی‌داری ($P < 0.0001$) از نظر ژنوتیپی در پلی مورفیسم TGF-1 β بین بیماران مبتلا به پریودنتیت و افراد سالم یافت نشد.

در مطالعات مقایسه‌ای بین بافت‌ها و مایع شیار لثه‌ای افراد مبتلا به پریودنتیت با افراد سالم، سایتوکاین‌های پیش التهابی، سایتوکاین‌های تنظیمی، سلول‌های التهابی، نوتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها در بافت‌های بیمار به مراتب بیشتر از بافت‌های نرمال بوده است. با نظر به اینکه سایتوکاین‌ها مانند TGF-1 β در بافت پریودنتیسم، جزء سیستم ایمنی بود، در کنترل عملکرد سلولی در هر دو حالت سلامت و بیماری نقش کلیدی دارند، حضور و غلظت آن‌ها در مایع شیار لثه‌ای می‌تواند به عنوان شاخصی برای تشخیص بیماری‌های پریودنتال مورد استفاده قرار گیرد.

Steinsvoll و همکاران (۲۶) در سال ۱۹۹۹ در آمریکا به بررسی اثر ضد التهابی TGF-1 β در بیماران مبتلا به پریودنتیت پرداختند که به این نتیجه TGF-1 β یک سایتوکاین است که باعث تحریک زخم می‌شود که اثر ضد التهابی آن باعث برهم خوردن تعادل دریافت پروتئین لثه و باعث ایجاد پاسخ ضدالتهابی می‌گردد.

Skalerič و همکاران (۱۴) در سال ۱۹۹۷ به بررسی تغییرات در

تشکر و قدردانی

این مقاله که استخراج از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد واحد سیرجان با کد ۹۸۱۴۵۳۰۹۶ بوده حاصل فعالیت آزمایشگاهی در زمینه دندانپزشکی و میکروب شناسی است. بدین وسیله از کلیه عزیزان و گروه تحقیقاتی پاسارگاد که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

با مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعات ذکر شده در آن‌ها از روش‌های انجام تحقیق و یا نژادهایی از جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند بنابراین مقایسه نتایج حاصل تحت تأثیر عوامل مختلفی چون فاصله نژادی و جغرافیایی بر الگوهای ژنوتایی جمعیت‌های مختلف بیان می‌گردد. مورد دیگر عوامل محیطی و عادات زندگی افرادی است که به عنوان نمونه در نظر گرفته می‌شوند که می‌تواند در نتایج تحقیق و ارتباط با بیماری تأثیر گذار باشند.

References

- 1- Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):727-52.
- 2- Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):879-925.
- 3- Smola S, Rettenberger G, Simmet T, Burysek L. Comparison of sample collection methods for the PCR detection of oral anaerobic pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(2):101-5.
- 4- Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):547-58.
- 5- Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, et al. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circ.* 2005;112(1):19-24.
- 6- Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *J Periodontol.* 2005;76(5):731-6.
- 7- Khader YS, Ta'ani Q. Periodontal diseases and the risk of preterm birth and low birth weight: A meta-analysis. *J Periodontol.* 2005;76(2):161-5.
- 8- Ebadian A, Radvar M, Arab H, Tavakkol Afshari J, Sargolzaei N, Gharegozloo S, et al. Analysis of Proinflammatory Cytokines Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis (GAgP). *J Mashhad Dent Sch.* 2009;33(3):231-40.
- 9- Kumar P, Griffen A, Barton J, Paster B, Moeschberger M, Leys E. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2003;82(5):338-44.
- 10- Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod.* 2002;28(10):679-83.
- 11- Paju S, Scannapieco F. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *J Oral Dis.* 2007;13(6):508-12.
- 12- Stein SH, Green BE, Scarbecz M. Augmented transforming growth factor- β 1 in gingival crevicular fluid of smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004;75(12):1619-26.
- 13- Wahl S, Costa G, Mizel D, Allen J, Skaleric U, Mangan D. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol.* 1993;64 (5 Suppl):450.
- 14- Skalerič U, Kramar B, Petelin M, Pavllia Z, Wahl SM. Changes in TGF- β 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(2):136-42.
- 15- Brook I. Bacterial infection and antibiotic treatment in chronic rhinosinusitis. *Chronic Rhinosinusitis: CRC Press;* 2007. 163-78.
- 16- Ligtenberg AJ, de Soet JJ, Veerman EC, Amerongen AvN. Oral diseases: From detection to diagnostics. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098(1):200-3.
- 17- Nagy E, Urbán E, Sóki J, Sóki J, Terhes G, Nagy K. The place of molecular genetic methods in the diagnostics of human pathogenic anaerobic bacteria: A minireview. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2006;53(2):183-94.
- 18- Brook I. Microbiology of acute sinusitis of odontogenic origin presenting with periorbital cellulitis in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007;116(5):386-8.
- 19- de Sousa ESO, Cortez ACA, Melhem MdSC, Frickmann H, de Souza JVB. Factors influencing susceptibility testing of antifungal drugs: a critical review of document M27-A4 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Braz J Microbiol.* 2020:1-10.
- 20- Cummins D. The impact of research and development on the prevention of oral diseases in children and adolescents: an industry perspective. *Pediatr Dent.* 2006;28(2):118-27.
- 21- Stefanopoulos PK, Kolokotronis AE. The clinical significance of anaerobic bacteria in acute orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(4):398-408.
- 22- Mandell B. Dolin: Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier. Bacterial Diseases: Bartonella, Including Cat-Scratch Disease. 2005:1870-5.
- 23- Brescó-Salinas M, Costa-Riu N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):E70.
- 24- Ghanbari R, Harzandi N, Abadi DS. Molecular detection of *Campylobacter rectus* infection in periodontal lesions referring to dental clinic of Tehran University. *Biotech Tarbiat Modares Univ.* 1395(2):7.
- 25- Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009;54:S11-S26.
- 26- Steinsvoll S, Halstensen T, Schenck K. Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol.* 1999;26(6):366-73.

- 27- Wright HJ, Chapple IL, Blair F, Matthews JB. Crevicular fluid levels of TGF β 1 in drug-induced gingival overgrowth. Arch Oral Biol. 2004;49(5):421-5.
- 28- Gürkan A, Afacan B, Emingil G, Töz H, Başkesen A, Atilla G. Gingival crevicular fluid transforming growth factor- β 1 in cyclosporine and tacrolimus treated renal transplant patients without gingival overgrowth. Arch Oral Biol. 2008;53(8):723-8.
- 29- Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Sheibak N. Association between TGF-BETA1 (-509) C/T gene polymorphism and tissue degradation level in chronic periodontitis: a stereological study. Gene Cell Tissue. 2015;2(3):e31698.