

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

امیر علیرمضانی^۱ - محمدحسین سالاری^۲ - دکتر محمدرضا پورمند^۷ - دکتر زینب کدخدای^۳ - عباس رحیمی فروشانی^۴ - فرزانه امین‌هراتی^۵ - صدیقه قورچیان^۶ - زهرا پاکباز^۱ - سید سعید اشراقی^{۷†}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی 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 پریدونتیکس، 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 فارغ‌التحصیلی، 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 Aliramezani¹, Mohammad Hosein Salari², Mohammad Reza Pourmand⁷, Zeinab Kadkhoda³, Abbas Foroushani⁴, Farzaneh Aminharati⁵, Sedigheh Ghourchian⁶, Zahra Pakbaz¹, 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 (PCR)

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

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

چکیده

زمینه و هدف: پریدونتیت 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 پریدونتوپاتوژن در مبتلایان به پریدونتیت با استفاده از دو روش کشت و مولکولی بود.

روش بررسی: در این بررسی صد نمونه از صد بیمار مبتلا به پریدونتیت بالغین شامل ۶۲ نفر زن و ۳۸ نفر مرد با دامنه سنی ۲۴-۷۵ سال (میانگین ۴۹±۱۱/۵ سال) مراجعه‌کننده به بخش پریدونتیکس 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 اگرگاتی باکتر اکتینوماایستم کومیتنس (Aa)، از ۲۰ بیمار پورفیروموناس 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 Pi و Pg جدا شد، به علاوه از ۳۳ بیمار دو یا چند گونه باکتری توأمآ جدا گردید.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش فراوانی باکتری‌های جدا شده در هر دو روش کشت و مولکولی به ترتیب مربوط به Aa، Pg و 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 قابل توجه می‌باشد. به هر حال برحسب شرایط و امکانات آزمایشگاه می‌توان از یک یا هر دو روش در تشخیص باکتری استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: پریدونتیت؛ کشت؛ PCR (Polymerase Chain Reaction)؛ باکتری‌های بی‌هوازی (پورفیروموناس ژنژیوالیس، پروتلا اینترمدیا)؛ باکتری کاپنوفیل (اکتینوماایستم کومیتنس)

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

مقدمه

به گمان آنها کشت بزاق می‌توانست فلور دهان را مشخص سازد. از این سال به بعد، با ابداع روش‌های 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 ارگانسیم‌های یافت شده در دهان دارد (۴). بزاق که مهم‌ترین و ماندگارترین منبع غذایی میکرواورگانسیم‌هاست، یک رژیم غذایی ضعیف برای ۲۰۰ تا ۳۰۰ گونه متنوع باکتریایی ساکن یا کلونیزه شده در دهان محسوب می‌شود (۵). از جمله 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 اگرگاتی باکتر اکتینوماایستم کومیتنس، پورفیروموناس ژنژیوالیس و پروتلا اینترمدیا واجد بیشترین نقش می‌باشند (۷،۸). هدف از انجام این مطالعه، شناسایی باکتری‌های غالب پریدونتوپاتوژن

پریدونتیت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دهان و از عوامل اصلی 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 میکرواورگانسیم‌ها 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 (اگرگاتی باکتر اکتینوماایستم کومیتنس، ایکنلا کورودنس و گونه‌های کاپنوسایتوفاگا) و همچنین باکتری‌های بی‌هوازی (پورفیروموناس ژنژیوالیس، پروتلا اینترمدیا، فوزوباکتریوم نوکلئاتوم، تانرلا فورسی تنسیس، تریونما دنتیکولا و گونه‌های اکتینوماایسس) نقش اساسی را ایفا می‌نمایند (۳،۴). تا سال ۱۹۶۳ میلادی، میکروباشناسان معتقد بودند که ترکیب فلور میکروبی در تمام سطوح دهان مشابه است (۱). آنها تمام کوشش خود را روی کشت بزاق متمرکز می‌کردند. زیرا

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 K₁ و همین استفاده شد.

به منظور انتخابی شدن محیط کشت برای پورفیروموناتس ژینزیوالیس 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 ۴۸-۷۲ 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 گسترده‌گی (Annealing) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله گسترده‌گی 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

در مبتلایان به پریدودنتیت 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 پریدودنتیت شامل ۶۲ نفر زن و ۳۸ نفر مرد با دامنه سنی ۲۴-۷۵ سال (میانگین ۴۹±۱۱/۵ سال) مراجعه‌کننده به بخش پریدودنتیکس 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 پریدودنتیت 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 برات (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 در حال جوش قرار داده شد. سپس در زمانی کمتر از ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

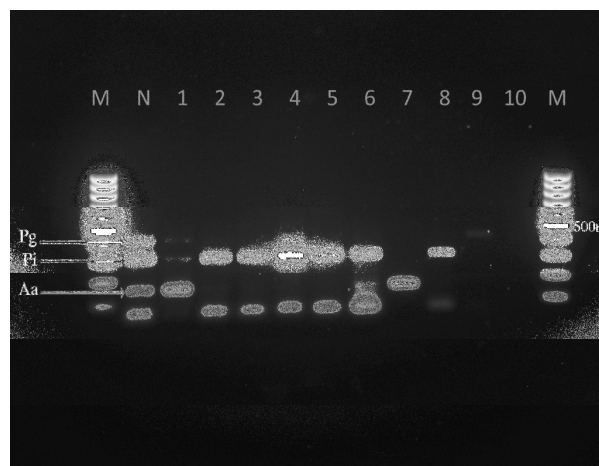
نام باکتری	مشخصات پرایمر	ژن موردنظر	اندازه محصول PCR
اگریگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس (Aa)	F: 5'-CGCCGTTTTTATTGCTCATT-3' R: 5'-CGACATCGATGGTTTCAAGTT-3'	tbp A1	160 base pair
پروتلا اینترمدیا (Pi)	F: 5'- GGAAATTGTTCGCGAGATGT-3' R: 5'- CATGGCCACCAGCAGGACGC-3'	tna A	317 bp
پورفیروموناتس ژینزیوالیس (Pg)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

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 ($P=0/57$).

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 کاپنوفیل بودند که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0/51$).

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 ($P=0/42$). روش کشت استاندارد طلائی 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.

اگرگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس ATCC 29523، پروتلا اینترمدیا ATCC 25611 و پورفیروموناتس ژینژیوالیس ATCC 33277 به 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+کاپنوفیل Pg+Pi) 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 اگرگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس، پروتلا اینترمدیا و پورفیروموناتس ژینژیوالیس در این تحقیق با دو روش کشت و مولکولی بررسی و در جدول‌های ۲ و ۳ نمایه شده است.

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

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

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

گروه سنی	نوع باکتری	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 میکروارگانیزم‌ها 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 از جمله 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، میکروارگانیزم‌های موجود در پلاک دندان سبب 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 در نهایت 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 ژنژیوالیس، 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 ژنژیوالیس تقریباً همخوانی دارد. در سال ۲۰۰۸، Herrera و همکاران (۱۴) در مطالعه بر روی پروفایل میکروبی زیر لثه‌ای 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 اگریگاتی باکتر اکتینومایستم 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

بررسی بر روی نسبت باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی در بیماران بالغ مبتلا به پرپودونتیت به این نتیجه رسیدند که درصد باکتری‌های هوازی به بی‌هوازی در جمعیت ۲۱ نفره مورد بررسی ۱ به ۳ می‌باشد، در حالی که در این مطالعه نسبت باکتری‌های کاپنوفیل به بی‌هوازی تقریباً ۱ به ۱ می‌باشد. در سال ۲۰۰۶، Jardim Junior و همکاران (۲۳) در مطالعه بر روی باکتری‌های عامل ژنژیویت و پرپودونتیت به این نتیجه دست یافتند که در جمعیت ۱۰۰ نفره مورد بررسی، اگرگاتی باکتراکتینومایستم کومیتنس بیشترین میزان جداسازی را دارد و همچنین در سال ۲۰۰۲، Fouad و همکاران (۲۴) در بررسی عفونت دهانی با روش PCR دریافتند که در میان ۲۴ نمونه مورد بررسی میزان اگرگاتی باکتراکتینومایستم کومیتنس بیشترین میزان جداسازی را دارد که با نتایج به دست آمده در این پژوهش هماهنگی دارد. لازم به ذکر است که روش مولکولی توام برای اولین بار بر روی باکتری‌های مذکور در ایران صورت پذیرفته است. روش کشت روش گلد استاندارد جهت کشت باکتری‌های فوق می‌باشد و توصیه می‌شود در کنار کار مولکولی به کشت ارگانیسیم‌های مذکور نیز توجه شود. با استفاده از روش مولکولی توام می‌توان سه باکتری فوق را همزمان شناسایی کرد و از هدر رفتن وقت در روش کشت جلوگیری نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر حمایت علمی و مالی تشکر می‌نماییم. لازم به ذکر است این مقاله طرح تحقیقاتی مورخ ۹۱/۱/۲۷ به شماره ۱۶۱۶۳ می‌باشد.

پورفیروموناس ژنژیوالیس و در نهایت باکتری پروتلا اینترمدیا قرار داشتند؛ در حالی که در سال ۲۰۱۰، Estrela و همکاران (۱۸) باکتری‌های پرپودونتاژ را به روش مولکولی توام بررسی و جداسازی کردند و به این نتیجه رسیدند که در میان جمعیت ۲۲ نفره مورد بررسی باکتری پورفیروموناس ژنژیوالیس بیشترین میزان جداسازی را دارد. این یافته نشان می‌دهد که درصد و نوع باکتری جدا شده، رابطه مستقیم با شرایط زندگی افراد در مناطق مختلف جغرافیایی نیز دارد. همچنین در سال ۲۰۰۹، Egwari و همکاران (۱۹) در مطالعه بر روی بیماران مبتلا به پرپودونتیت در نیجریه دریافتند که در جمعیت ۱۶۲ نفره مورد بررسی، ۱۸/۱ درصد دارای پورفیروموناس ژنژیوالیس، ۹/۶ درصد دارای پروتلا اینترمدیا و ۶/۴ درصد دارای اگرگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس می‌باشند. تفاوت آماری معنی‌داری از نظر جمعیت باکتری‌های فوق بین مردان و زنان مشاهده نمی‌شود؛ در حالی که در سال ۲۰۱۰، Rotimi و همکاران (۲۰) در بررسی باکتری‌های عامل پرپودونتیت در کودکان کویتی با روش مولکولی توام به این نتیجه رسیدند که در جمعیت ۲۴۰ نفره مورد بررسی شامل ۱۲۰ دختر و ۱۲۰ پسر، ۱۷/۱ درصد از نظر این باکتری‌ها مثبت بوده و بیشترین میزان جداسازی مربوط به اگرگاتی باکتر اکتینومایستم کومیتنس می‌باشد. همچنین در سال ۲۰۰۶، Tanner و همکاران (۲۱) در بررسی مولکولی با روش مولکولی توام بر روی باکتری‌های زیر لثه‌ای و زبانی جدا شده در مرحله اولیه پرپودونتیت به این نتیجه رسیدند که در جمعیت ۲۲۱ نفره مورد بررسی میزان باکتری پورفیروموناس ژنژیوالیس از بقیه باکتری‌ها بیشتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۶، Daniluk و همکاران (۲۲) در

منابع:

- 1- Rakic M, Zelic K, Pavlica D, Hadzimirhajlovic 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

- 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.