

## بررسی شیوع باکتری های بی هوازی گرم منفی در بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن

فرانک رضایی<sup>1</sup>، مریم چلبی<sup>2</sup>، شراره مقیم<sup>3</sup>، احمد مقاره عابد<sup>4</sup>، جمشید فخری<sup>3</sup>

1- مربی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

2- کارشناسی ارشد میکروب شناسی، کارشناس آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه

3- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

4- استادیار، گروه پریدونتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

یافته / دوره دهم / شماره 2 / تابستان 87 / مسلسل 36

### چکیده

دریافت مقاله: 87/1/10، پذیرش مقاله: 87/4/11

Ø مقدمه: پریدونتیت یک بیماری عفونی شایع و التهابی است که باعث تخریب بافت های نگهدارنده دندان و از دست رفتن دندان می شود. یافته های اخیر نشان می دهد که عفونت پریدونتال به طرز قابل توجهی باعث افزایش خطر ابتلا به بعضی از بیماری های سیستمیک می گردد. از مهمترین عوامل ایجاد عفونت در پریدونشیوم، باکتری ها به ویژه پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس می باشند. در بین روش های تشخیص باکتری ها به نظر می رسد Multiplex PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است با این روش می توان چند نوع میکروارگانیزم را به طور همزمان با هم تشخیص داد. Ø مواد و روش ها: نمونه پلاک زیر لثه ای از 61 بیمار مبتلا به پریدونتیت مزمن (34 زن، 27 مرد، دامنه سنی 24-69 سال، میانگین سنی 43 سال) و 40 فرد سالم (22 زن، 18 مرد، دامنه سنی 21-69 سال، میانگین سنی 41 سال) که به بخش پریدونتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده بودند، گرفته شد. سپس DNA نمونه ها استخراج و Multiplex PCR انجام شد.

Ø یافته ها: باکترئیدس فورسیتوس 52/50% از بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن تشخیص داده شد در حالی که در هیچ سایت سالمی دیده نشد و پورفیروموناس ژنژیوالیس در 83/61% از بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن و 40% از افراد سالم تشخیص داده شد. ( $p < 0/05$ ).

Ø بحث و نتیجه گیری: به کمک Multiplex PCR می توان این دو باکتری را به صورت همزمان تشخیص داد و نتایج بدست آمده نشان می دهد پورفیروموناس ژنژیوالیس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریدونتیت مزمن برخوردار است. با توجه به این که بیماری پریدونتیت یکی از عوامل مستعد کننده بیماری های سیستمیک است تشخیص و درمان به موقع این بیماری حائز اهمیت می باشد.

Ø کلید واژه ها: پریدونتیت، باکتری های بی هوازی گرم منفی

آدرس مکاتبه: خرم آباد، جاده کمالوند، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی

پست الکترونیک: [frezaei59@gmail.com](mailto:frezaei59@gmail.com)

## مقدمه

پریودنتیت یک بیماری عفونی شایع و التهابی است که باعث تخریب بافت‌های نگهدارنده دندان و متعاقب آن شل شدن و از دست رفتن دندان می‌شود (2,1). این بیماری با اشکال مختلف بالینی از شیوع بالایی در بین بیماری‌های دهان و دندان برخوردار است (3). یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که عفونت پریودنتال به طرز قابل توجهی باعث افزایش خطر ابتلا به بعضی از بیماری‌های سیستمیک مانند بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، زایمان زودرس و اختلالات تنفسی می‌گردد (4,5,6,7,8). یکی از عوامل ایجاد عفونت در پریودنشیوم، باکتری‌ها می‌باشند. از مهمترین باکتری‌های موجود می‌توان به اکتینوباسیلوس اکتینومیستم کومیتانس، ایکنلا کورودنس، پورفیروموناس ژنژیوالیس، باکترئیدس فورسیتوس، پرووتلا اینترمدیا و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم اشاره کرد (9). در بین باکتری‌های مذکور، پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (10). چندین روش برای تشخیص باکتری‌های موجود در پلاک وجود دارد که شامل ایمنوفلئورسنت، الایزا، تست‌های بیوشیمیایی، کشت و روش‌های مولکولی (PCR) می‌باشند. استفاده از تکنیکی نظیر کشت به دلیل دارا بودن حساسیت و ویژگی پائین، وقت‌گیر و گران‌بودن مقرون به صرفه نیست (3,11). امروزه از PCR به علت حساسیت و ویژگی بالای آن و همچنین ذخیره در زمان، هزینه و نیروی انسانی استفاده می‌شود (12). در سال‌های اخیر جهت انجام PCR از ژن 16S rRNA باکتری‌ها برای تشخیص آن‌ها استفاده می‌شود توالی نوکلئوتیدی بعضی قسمت‌های این ژن شدیداً حفاظت شده و سایر نواحی شدیداً متغیر است. در روش PCR، ما قادر به تشخیص یک گونه باکتری هستیم در حالی که با استفاده از روش Multiplex PCR می‌توان چند نوع میکروارگانیسم را به طور همزمان با هم تشخیص داد. از مزایای روش مذکور صرفه جویی در هزینه، زمان و نیروی انسانی است (13). هدف ما در مطالعه

حاضر بررسی شیوع پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن به وسیله روش Multiplex PCR است.

## مواد و روشها

جمعیت مورد مطالعه: نمونه پلاک زیر لثه‌ای از 61 بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن (34 زن، 27 مرد، دامنه سنی 24-69 سال، میانگین سنی 43 سال) و 40 فرد سالم (22 زن، 18 مرد، دامنه سنی 21-69 سال، میانگین سنی 41 سال) که به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده بودند، گرفته شد. معیارهای انتخاب افراد عبارت بودند از:

الف) حضور یک سایت با عمق پروبینگ (PD) <sup>1</sup> بیشتر یا مساوی 6 میلی‌متر

ب) عدم وجود بیماری سیستمیک

ج) عدم درمان با آنتی‌بیوتیک حداقل در 6 ماه گذشته

خ) ایندکس لثه‌ای بالا ( $GI = 2-3$ )<sup>2</sup>

ح) وجود التهاب

ی) خونریزی بعد از پروبینگ بیشتر از 3 میلی‌متر عمق.

جمع‌آوری نمونه بعد از برداشت پلاک فوق لثه‌ای، یک کورت استریل پریودنتال به داخل پاکت پریودنتال مورد بررسی به آرامی فرو برده و از پلاک زیر لثه‌ای با یک حرکت ضربه ای برداشته می‌شد (14). نمونه‌های پلاک به لوله اپندروف حاوی 500 میکرولیتر بافر TE<sup>3</sup> انتقال داده و سپس توسط ورتکس هموژن گردید و نمونه‌ها تا قبل از آزمایشات بعدی در فریزر -70 درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های پلاک: DNA به وسیله روش فنل - کلروفرم استخراج گردید. ابتدا نمونه‌ها را در سانتریفیوژ با دور 8000g به مدت 3 دقیقه قرار دادیم سپس مایع رویی را برداشته و به 1/10 حجم آن SDS 10% اضافه

1. Probing depth
2. Gingival Index
3. 10 mM Tris-hydrochloride, 1 mM EDTA, pH 8

نمودیم و آن را در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه گذاشتیم. به هر نمونه سه مرتبه فنل-کلروفرم اضافه نمودیم و بعد از رسوب دادن DNA با استات سدیم و 0/5 میلی لیتر اتانل مطلق سرد، DNA را با اتانل 70% شسته و بعد از خشک نمودن رسوب، آن را در 30-50 میکرولیتر بافر TE حل کرده و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد ذخیره کردیم. تهیه پرایمر: آنالیز Multiplex PCR جهت تشخیص پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس با استفاده از پرایمرهای ژن 16S rRNA قبلاً توسط ترن و رودنی<sup>1</sup> انجام شد (15).

طول محصول مورد نظر 745 جفت باز (bp)<sup>2</sup> برای باکترئیدس فورسیتوس و 197 جفت باز برای پورفیروموناس ژنژیوالیس است.

توالی نوکلئوتیدهای پرایمرهای انتخاب شده عبارتند از: پرایمر پیش رو مختص به گونه باکترئیدس فورسیتوس:

5'-TAC AGGGGA ATA AAA TGA GAT ACG-3'  
پرایمر پیش رو مختص به گونه پورفیروموناس ژنژیوالیس:  
5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAAACC-3'  
پرایمر معکوس حفاظت شده:

5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'  
Multiplex PCR با پرایمرهای مختص به گونه و

حفاظت شده ژن 6S rRNA:

در هر واکنش Multiplex PCR حجم محلول 50master mix میکرولیتر متشکل از 5 واحد آنزیم Taq DNA پلی مراز، بافر PCR با غلظت 1X، Mg cl<sub>2</sub> با غلظت 2 میلی‌مولار، Mixed dNTP از هر کدام 0/5 میلی مولار، پرایمر پیش رو مختص به گونه باکترئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس از هر کدام 12/5 پیکومول، پرایمر معکوس حفاظت شده از ژن 16S rRNA، 25 پیکومول و 5 میکرولیتر از DNA الگو، سپس با اضافه کردن آب دو بار تقطیر حجم را به 50 میکرولیتر رساندیم. آمپلی فیکیشن در دستگاه ترموسایکلر<sup>3</sup> انجام گرفت.

نمونه‌ها ابتدا در دمای 95 °C به مدت 5 دقیقه دناتوره شدند سپس یک مرحله دناتوراسیون در دمای 94 °C به مدت 1 دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای 59 °C به مدت 45 ثانیه و مرحله گسترده‌گی پرایمرها در دمای 72 °C به مدت یک دقیقه و 30 ثانیه به تعداد 34 سیکل و در نهایت یک مرحله گسترده‌گی 72 °C به مدت 2 دقیقه انجام شد. در هر آزمایشی یک لوله جهت کنترل منفی که به جای DNA از آب دیونیزه و یک لوله جهت کنترل مثبت با DNA استخراج شده از سویه‌های استاندارد دو باکتری باکترئیدس فورسیتوس TRG و پورفیروموناس ژنژیوالیس ATCC 33277 استفاده شد.

الکتروفورز بعد از انجام Multiplex PCR: آمپلیکون ها حاصل از Multiplex PCR به وسیله الکتروفورز 4V/cm بافر TBE با استفاده از 10 میکرولیتر محصول PCR در ژل آگارز 2/1 درصد (ساخت شرکت فرمنتاس) حاوی 0/5 μg/ml اتیدیوم بروماید مشخص شدند. از یک مارکر 100 جفت بررسی وزن مولکولی نمونه‌ها استفاده شد و متعاقب آن باندهای DNA در زیر نور اولترا ویوله با طول موج 300 نانومتر مشاهده گردید.

### آنالیز آماری

از تست کای اسکور جهت وجود باکترئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس در بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن و افراد سالم استفاده شد. (p < 0/05).

### یافته ها

شیوع دو باکتری برای هر فرد بررسی گردید. توزیع پریدونتوپاتوزن در افراد سالم و بیمار متفاوت بود. باکترئیدس فورسیتوس در 52/50% از بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن تشخیص داده شد، در حالی که در هیچ سایت سالمی دیده نشد

1. Tran and Rudney
2. Base pair
3. Eppendorf master cycler personal

بررسی های میکروب شناسی جهت تشخیص باکتری های بیماری زای پریدونتال ممکن است سبب تسریع و تسهیل درمان گردد (12). در تحقیقی که بر روی ارتباط باکترئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس با بیماری پریدونتال صورت گرفت نشان دادند که حضور باکتری ها در افراد سالم از نظر پریدونتیت در مقایسه با افراد بیمار بسیار کمتر است. پس پیشنهاد کردند که این باکتری ها ممکن است پاتوژن های اگزوژن باشند (16) اما برخی مطالعات که در کشورهای در حال توسعه - جایی که تاریخچه بیماری کمتر تحت تاثیر عوامل خارجی مانند مصرف آنتی بیوتیک و معاینات مرتب بهداشت دهان قرار می گیرد- در این زمینه انجام گرفته وجود پاتوژن های پریدونتال در افراد بدون علائم بالینی بیماری را گزارش نموده اند (17,18,19,20). در مطالعه ای که توسط Eick و همکارانش انجام گرفت شیوع پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس در پلاک های زیر لثه ای بیماران مبتلا به پریدونتیت 76% و 80% بود (21). در تحقیق ژان<sup>1</sup> و همکارانش پورفیروموناس ژنژیوالیس از 91/5 درصد پلاک دندان مبتلایان به پریدونتیت جدا شد (22). سوکرانسکی<sup>2</sup> و همکارانش شیوع پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس در پاکت های با عمق های مختلف پریدونتال بیمار، را بررسی و مشاهده کردند پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس در پاکت های عمیق نسبت به پاکت های سطحی بیشتر یافت می شوند (23). کاندراس<sup>3</sup> باکترئیدس فورسیتوس را در 28/9% مبتلایان به پریدونتیت جدا کرد که نسبت به سایر مطالعات انجام گرفته از شیوع پائینی برخوردار است (24). زامبون<sup>4</sup> و همکارانش پیشنهاد کردند پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس ارتباط قوی با شدت پریدونتیت دارند (25). تحقیقات مختلف گزارش کردند که بین عمق پاکت و افزایش تعداد

همچنین پورفیروموناس ژنژیوالیس در 83/61% از بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن و 40% از افراد سالم تشخیص داده شد. در این مطالعه، تفاوت معنی داری بین گروه های سالم و بیمار ( $p < 0/40$ ) و نیز همچنین تفاوت معنی داری بین مردان و زنان مشاهده نگردید. ارتباط بین شیوع پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس با جنس در بیماران مبتلا به پریدونتیت مزمن طبق آزمون دقیق فیشر جهت بررسی پورفیروموناس ژنژیوالیس ( $p < 0/26$ ) و باکترئیدس فورسیتوس ( $p < 0/33$ ) معنی دار نیست. شیوع پریدونتیت در مردان نسبت به زنان بیشتر بود. تشخیص DNA باکترئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس در ژل آگارز الکتروفورز در شکل 1 نشان داده شده است.



شکل 1- چاهک 1، کنترل مثبت (745 و 197 جفت باز) چاهک 13؛ کنترل منفی؛ 2،3،4،5،6،7،8،9،10،11،12،13 نمونه هایی هستند که مثبت شدند و سایر خانه ها نمونه های منفی هستند.

## بحث و نتیجه گیری

مطالعات میکروبیولوژی پلاک زیر لثه ای را ترکیبی کمپلکس و متنوع نشان داده و بالغ بر 500 گونه باکتری مختلف در بافت دهان شناسایی نموده اند (11). تحقیقات انجام شده بر روی اثرات درمان های مختلف بیانگر این مطلب هستند که درمان هایی که منجر به توقف یا حذف باکتری ها می گردند منجر به بهبود پاسخ به درمان های کلینیکی می گردد بنابراین

1. Zhan & et al  
2. Socransky & et al

3. Conrads  
4. Zambon & et al

پروبینگ نیز احتمالاً باعث افزایش تشخیص دو باکتری فوق گردد. این مطالعه می تواند اساس و پایه ای برای ادامه مطالعاتی جهت تشخیص سایر فاکتورهایی که ممکن است باعث شروع یا پیشرفت بیماری پریدونتال گردد باشد. به کمک Multiplex PCR می توان این دو باکتری را به صورت همزمان تشخیص داد و نتایج بدست آمده نشان می دهد پورفیروموناس ژنژیوالیس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریدونتیت مزمن برخوردار است. با توجه به این که بیماری پریدونتیت یکی از عوامل مستعد کننده بیماری های سیستمیک است تشخیص و درمان به موقع این بیماری حائز اهمیت می باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی و از بخش پریدونتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صمیمانه تشکر می نمایم.

پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس ارتباط وجود دارد و پیشنهاد کردند که باکتری های فوق داری نقش اتیولوژیک در پیشرفت پریدونتیت دارند (26,27,28). برخی از تحقیقات نیز هیچ گونه ارتباطی پیدا نکردند (29,30). نتایج حاصل از تحقیق ما نشان می دهد که پورفیروموناس ژنژیوالیس نسبت به باکترئیدس فورسیتوس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریدونتیت مزمن برخوردار می باشد. با توجه به این که بیماری پریدونتیت یکی از عوامل مستعد کننده بیماری های سیستمیک است تشخیص و درمان به موقع این بیماری حائز اهمیت می باشد. کاربرد پارامترهای بالینی در انتخاب سایت نمونه گیری به ویژه اندازه گیری عمق پروب باعث افزایش احتمال تشخیص پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکترئیدس فورسیتوس می گردد. همچنین انتخاب سایت نمونه گیری بر اساس از دست رفتن سطح اتصال بالینی و خونریزی بعد از

## References

1. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4):727-752
2. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 879-925
3. Smola SF, 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): 101-105
4. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(4): 547-558
5. Beck JD, Eke P, Heiss G, Madianos P, Couper D, Lin D, Moss K, Elter J, Offenbacher S. Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation.* 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): 731-736
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): 161-165
8. Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease?. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1): 127-141
9. Dzink JL, Haffajee A D, Socransky SS. The predominant cultivable microbiota of active and inactive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 316-323
10. Kumar PS, Griffen AI, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New Bacterial Species Associated with Chronic Periodontitis. *J Dent Res.* 2003; 82(5): 338-344
11. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(11):4950-4954
12. Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim K. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. *Microbiol Immunol.* 2005; 49(1): 9-16
13. Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(11): 2674
14. Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 33-62
15. Tran SD, Rudney JD Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11): 3504-3508
16. Genco RJ, Zambon JJ, Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 1986; 1(1): 73-81
17. Dahlen G, Manji F, Baelum V. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(1): 35-42

18. Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil Trans epithelial migration. *Infect Immun.* 1997; 65(10): 3983-3990
19. Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol.* 1997; 24(11): 830-835
20. Papapanou PN, Sellen A, Wennstrom JL, Dahlen G. An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(1): 24-29
21. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(7): 638-644
22. Zhan DF, Liu ZW, Xia XP, Hu JC, Chen LL, Yan J. Study on the detection of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* and the correlation between coinfections of the microbes and levels of chronic periodontitis lesion. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2005; 26(2): 120-123
23. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998; 25(2): 134-144
24. Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I, Lamer F, Lutticken R. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(5): 1621-1624
25. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol.* 1996; 1(1): 879-925
26. Loesche WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van poperin N, Hujoel PP. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture considered the primary reference standard. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 418-426
27. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol.* 1986; 1(1):48-57
28. Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2001; 72(10): 1354-1363
29. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol.* 1985; 56(8): 447-456
30. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol.* 1985; 12(8): 648-659