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

فرانک رضایی[1]، مریم چلبی[2]، شراره مقیم[3]، احمد مقاره عابد[4]، جمشید فقری[3]

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 پریودنتولوژی، 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: پریودنتیت یک بیماری عفونی شایع والتهابی است که باعث تخریب بافت های نگهدارنده دندان و از دست رفتن دندان می‌شود. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که عفونت پریودنتال به طرز قابل توجهی باعث افزایش خطر ابتلا به بعضی از بیماری‌های سیستمیک می‌گردد. از مهمترین عوامل ایجاد عفونت در پریودنشیوم، باکتری‌ها به ویژه پورفیرومونواس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس می‌باشند.در بین روش‌های تشخیص باکتری‌ها به نظر می رسد **Multiplex PCR** از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است با این روش می‌توان چند نوع میکروارگانیسم را به طور همزمان با هم تشخیص داد.

Ø مواد و روش‌ها: نمونه پلاک زیر لثه‌ای از 61 بیمار مبتلا به پریودنتیت مزمن (34 زن، 27 مرد، دامنه سنی 69-24 سال، میانگین سنی 43 سال) و 40 فرد سالم (22 زن، 18 مرد، دامنه سنی 69-21 سال، میانگین سنی 41 سال)که به بخش پریودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان مراجعه کرده بودند، گرفته شد.سپس **DNA** نمونه‌ها استخراج و **Multiplex PCR** انجام شد.

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

Ø بحث و نتیجه‌گیری: به کمک**Multiplex PCR** می‌توان این دو باکتری را به صورت همزمان تشخیص دادو نتایج بدست آمده نشان می‌دهد پورفیرومونواس ژنژیوالیس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریودنتیت مزمن برخوردار است . با توجه به این که بیماری پریودنتیت یکی از عوامل مستعد کننده بیماری‌های سیستمیک است تشخیص و درمان به موقع این بیماری حائز اهمیت می‌باشد.

Ø کلید واژه‌ها: پریودنتیت، 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

مقدمه

پریودنتیت یک بیماری عفونی شایع والتهابی 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 (8،7،6،5،4). یکی از عوامل ایجاد عفونت در پریودنشیوم، باکتری‌ها می‌باشند . از مهمترین باکتری‌های موجود می‌توان به اکتینوباسیلوس اکتینومیستم کومیتانس، ایکنلا کورودنس، پورفیرومونواس ژنژیوالیس، باکتروئیدس فورسیتوس، پرووتلا اینترمدیا و فوزوباکتریوم نوکلئاتوم اشاره کرد (9). در بین باکتری‌های مذکور، پورفیرومونواس ژنژیوالیس و باکتروئیدس 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(11،3). 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 آن‌هااستفاده 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 حالی‌که با استفاده از روش Multiplex PCRمی‌توان 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 پورفیرومونواس ژنژیوالیس و باکتروئیدس 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 69-24 سال، میانگین سنی 43 سال) و 40 فرد سالم (22 زن، 18 مرد، دامنه سنی 69-21 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)[1] 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[2])

ح) وجود التهاب

ی) خونریزی بعد از پروبینگ بیشتر از 3 میلی متر 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[3] 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 دادنDNA 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 50-30 میکرولیتر بافر TE حل کرده و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد ذخیره کردیم.

تهیه پرایمر: آنالیز Multiplex PCR جهت تشخیص پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس با استفاده از پرایمرهای ژن 16S rRNA قبلاً توسط ترن و رودنی[1] انجام شد (15).

طول محصول مورد نظر 745 جفت باز (bp[2]) برای باکتروئیدس فورسیتوس و 197 جفت باز برای پورفیروموناس ژنژیوالیس است.

توالی نوکلئوتیدهای پرایمرهای انتخاب شده عبارتند از :

پرایمر پیش رو مختص به گونه باکتروئیدس 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 آنزیمTaq DNA پلی مراز ، بافرPCR با غلظت 1X ، Mg cl2 با غلظت 2 میلی‌مولار، Mixed dNTP از هر کدام 0/5 میلی مولار، پرایمر پیش رو مختص به گونه باکتروئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس از هر کدام 12/5 پیکومول ، پرایمر معکوس حفاظت شده از ژن 16S rRNA، 25 پیکومول و 5 میکرولیتر ازDNA الگو، سپس با اضافه کردن آب دو بار تقطیر حجم را به 50 میکرولیتر رساندیم.آمپلی فیکیشن در دستگاه ترموسایکلر[3] انجام گرفت.

نمونه‌ها ابتدا در دمای 95 °C به مدت 5 دقیقه دناتوره شدندسپس یک مرحله دناتوراسیون در دمای 94 °C به مدت 1 دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای 59 °C به مدت 45 ثانیه و مرحله گستردگی پرایمرها در دمای 72 °C به مدت یک دقیقه و 30 ثانیه به تعداد 34 سیکل ودر نهابت یک مرحله گستردگی72 °C به مدت2 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 باکتروئیدس فورسیتوس TRGو پورفیروموناس ژنژیوالیس ATCC 33277 استفاده شد.

الکتروفورز بعد از انجام Multiplex PCR: آمپلیکون ها ی حاصل ازMultiplex PCR به وسیله الکتروفورز 4V/cm بافر TBE با استفاده از 10 میکرولیتر محصول PCR در ژل آگارز2 /1 درصد (ساخت شرکت فرمنتاس) حاوی 0/5 µg/ml اتیدیوم بروماید مشخص شدند.از یک مارکرbp 100 جهت بررسی وزن مولکولی نمونه‌ها استفاده شدو متعاقب آن باندهای DNA در زیر نور اولترا ویوله با طول موج 300 نانومتر مشاهده گردید.

آنالیز آماری

از تست کای‌اسکوئر جهت وجود باکتروئیدس فورسیتوس و پورفیروموناس ژنژیوالیس در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن و افراد سالم استفاده شد. ($p < 0/05$).

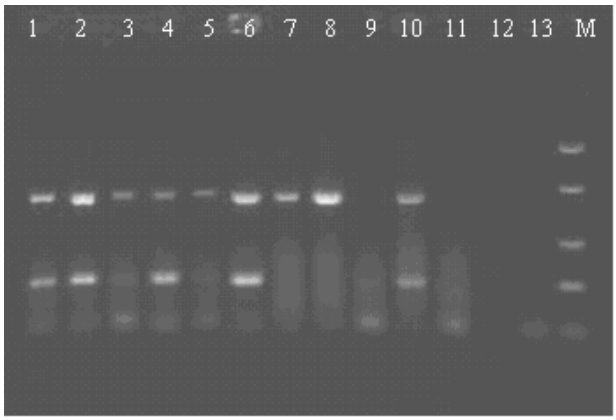
یافته ها

شیوع دو باکتری برای هر فرد بررسی گردید. توزیع پریودنتوپاتوژن در افراد سالم و بیمار متفاوت بود.باکتروئیدس فورسیتوس در52/50% از بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن تشخیص داده شد، در حالی که در هیچ سایت سالمی دیده نشد

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

،همچنین پورفیرومونـاس ژنژیوالیس در 83/61% از بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن و 40% از افراد سالم تشخیص داده شد.

در این مطالعه ،تفاوت معنی‌داری بین گروه های سالم و بیمار ($p<0/40$) و نیز همچنین تفاوت معنی‌داری بین مردان و زنان مشاهده نگردید. ارتباط بین شیوع پورفیرومونـاس ژنژیوالیس وباکتروئیدس فورسیتوس با جنس در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن طبق آزمون دقیق فیشر جهت بررسی پورفیرومونـاس ژنژیوالیس ($p<0/26$) و باکتروئیدس فورسیتوس ($p<0/33$) معنی‌دار نیست. شیوع پریودنتیت در مردان نسبت به زنان بیشتر بود. تشخیصDNA باکتروئیدس فورسیتوس و پورفیرومونـاس ژنژیوالیس در ژل آگارز الکتروفورز در شکل 1 نشان داده شده است.



شکل1- چاهک1 ، کنترل مثبت (745 و 197 جفت باز) چاهک13؛ کنترل منفی؛ 2،3،4، 5،6، 6،7،8،9،10 نمونه‌هایی هستند که مثبت شدندو سایر خانه‌ها نمونه‌های منفی هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات میکروبیولوژی پلاک زیر لثه‌ای را ترکیبی کمپلکس و متنوع نشان دادهو بالغ بر 500 گونه باکتری مختلف در بافت دهان شناسایی نموده‌اند (11). تحقیقات انجام شده بر روی اثرات درمان‌های مختلف بیانگر این مطلب هستند که درمان هایی که منجر به توقف یا حذف باکتری‌ها می‌گردند منجر به بهبود پاسخ به درمان‌های کلینیکی می‌گردد بنابراین بررسی‌های میکروب شناسی جهت تشخیص باکتری‌های بیماری‌زای پریودنتال ممکن است سبب تسریع و تسهیل درمان گردد (12). در تحقیقی که بر روی ارتباط باکتروئیدس فورسیتوس و پورفیرومونـاس ژنژیوالیس با بیماری پریودنتال صورت گرفت نشان دادند که حضور باکتری‌ها در افراد سالم از نظر پریودنتیت در مقایسه با افراد بیمار بسیار کمتر است.پس پیشنهاد کردند که این باکتری‌ها ممکن است پاتوژن های اگزوژن باشند (16) اما برخی مطالعات که در کشورهای در حال توسعه - جائی که تاریخچه بیماری کمتر تحت تاثیر عوامل خارجی مانند مصرف آنتی بیوتیک و معاینات مرتب بهداشت دهان قرار می‌گیرد- در این زمینه انجام گرفته وجود پاتوژن‌های پریودنتال در افراد بدون علائم بالینی بیماری را گزارش نموده اند (17،18،19،20). در مطالعه ای که توسط Eickو همکارانش انجام گرفت شیوع پورفیرومونـاس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس در پلاک‌های زیر لثه‌ای بیماران مبتلا به پریودنتیت 76%و 80% بود (21). درتحقیق ژان[1] و همکارانش پورفیرومونـاس ژنژیوالیس از 91/5 درصد پلاک دندان مبتلایان به پریودنتیت جدا شد(22). سوکرانسکی[2] و همکارانش شیوع پورفیرومونـاس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس در پاکت‌های با عمق‌های مختلف پریودنتال بیمار، را بررسی و مشاهده کردند پورفیرومونـاس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس در پاکت‌های عمیق نسبت به پاکت-های سطحی بیشتر یافت می‌شوند (23). کاندراس[3]، باکتروئیدس فورسیتوس را در 28/9 % مبتلایان به پریودنتیت جدا کرد که نسبت به سایر مطالعات انجام گرفته از شیوع پائینی برخوردار است (24). زامبون[4] و همکارانش پیشنهاد کردند پورفیرومونـاس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس ارتباط قوی با شدت پریودنتیت دارند (25). تحقیقات مختلف گزارش کردند که بین عمق پاکت و افزایش تعداد

1. Zhan & et al
2. Socransky & et al
3. Conrads
4. Zambon & et al

پورفیروموناس ژنژیوالیس و باکتروئیدس فورسیتوس ارتباط وجود داردو پیشنهاد کردند که باکتری‌های فوق داری نقش اتیولوژیک در پیشرفت پریودنیت دارند (28،27،26). برخی از تحقیقات نیز هیچ گونه ارتباطی پیدا نکردند (30،29). نتایج حاصل از تحقیق ما نشان می‌دهد که پورفیروموناس ژنژیوالیس نسبت به باکتروئیدس فورسیتوس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریودنتیت مزمن برخوردار می‌باشد.با توجه به این که بیماری پریودنتیت 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 باکتروئیدس فورسیتوس می گردد.همچنین انتخاب سایت نمونه گیری بر اساس از دست رفتن سطح اتصال بالینی و خونریزی بعد از 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 پریودنتال گردد باشد. به کمک Multiplex PCR می‌توان این دو باکتری را به صورت همزمان تشخیص دادو نتایج بدست آمده نشان می‌دهد پورفیروموناس ژنژیوالیس از اهمیت بیشتری در ایجاد پریودنتیت مزمن برخوردار است . با توجه به این که بیماری پریودنتیت یکی از عوامل مستعد کننده بیماری‌های سیستمیک است تشخیص و درمان به موقع این بیماری حائز اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

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 Al, 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, Vandenbroucke-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 Actinobacillusactinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Clin Microbiol. 1996; 34(11): 2674
14. Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. Periodontol 200 . 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