زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 2، پاییز و زمستان 1395

تشخیص مولکولی آلودگی به *کمپیلوباکتر رکتوس* در ضایعات پریودنتال بیماران مراجعه کننده به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه تهران

رویا قنبری[1]، دکتر ناصر هرزندی[2]، دکتر سمانه دولت آبادی[3]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی،علوم وتحقیقات خراسان رضوی، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
2-استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایر ان
3- استادیار گروه زیست شناسی،واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

* کرج، صندوق پستی 313- 31485
naser.harzandi@Kiau.ac.ir
(دریافت مقاله: 94/3/6 پذیرش مقاله: 94/6/3)

چکیده- *کمپیلوباکتررکتوس* از عوامل باکتریایی مهم دخیل در موارد پریودنتیت در بسیاری از مناطق جهان می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی مولکولی آلودگی به *کمپیلوباکتررکتوس* در ضایعات پریودنتال بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه تهران انجام گردید.

نمونه‌گیری از 40 نفر از بیماران در عمیق‌ترین ناحیه از پاکت پریودنتال با استفاده از کن کاغذی و توسط متخصصان مرکز درمانی انجام گردید. استخراج DNA با استفاده از DNP^{TM} Kit محصول شرکت سیناژن صورت گرفته و روش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه *کمپیلوباکتررکتوس* و سویه استاندارد باکتری، ATCC32238 به عنوان کنترل مثبت انجام گردید. با استفاده از نرم‌افزار SPSS، و به کارگیری آزمون t و مربع کای اختلاف میزان آلودگی به باکتری و نیز عمق شیار لثه‌ای در دوجنس و نیز گروه‌های سنی مختلف از نظر آماری بررسی شد.

یافته‌های حاصل از بررسی مولکولی نشان‌دهنده تشکیل قطعه 598 جفت بازی و آلودگی به *کمپیلوباکتررکتوس* در 18 نمونه (45% افراد مبتلا) بود. میانگین عمق شیار لثه‌ای در زنان نسبت به مردان بالاتر بود ولی اختلاف میزان آلودگی به باکتری در دو جنس و نیز میانگین عمق شیار لثه در گروه‌های سنی مختلف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

یافته‌های تحقیق حاضر ضمن تایید حضور *کمپیلوباکتررکتوس* 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.

کلیدواژگان: *کمپیلوباکتر رکتوس*، پریودنتیت، PCR.

1- مقدمه

علت عمده بیماری‌های لثه‌ای از جمله ضایعات پریودنتال -همانند پوسیدگی دندان‌ها- تشکیل پلاک میکروبی است که مجموعه‌ای حاصل از حدود شصت نوع میکروب موجود در محوطه دهانی است که روی تمام سطوح دندان و درون شیار لثه‌ای را فرا می‌گیرد. با عمیق و عمیق‌ترشدن "پاکت" (شیارلثه)، کم‌کم استخوان و رباط دندانی (لیگامان پریودنتال) نیز که دندان را بطور محکم به دیواره حفره استخوانی متصل می‌کند، درگیر و تخریب گشته و دندان لق می‌شود. تخریب و تحلیل استخوان اطراف دندان ضایعه‌ای غیرقابل برگشت است. گونه‌های مختلف *کمپیلوباکتر* به عنوان یکی از عوامل مرتبط با ضایعات پریودنتال مطرح شده‌اند که عبارتند از: *کمپیلوباکتر رکتوس*[1]، *کمپیلوباکتر گراسیلیس*[2]، *کمپیلوباکتر کوروووس*[3]، *کمپیلوباکترکانسیسوس*[4]، *کمپیلوباکتر شوآی*[5]

کمپیلو باکتر رکتوس: یک باکتری گرم منفی بی‌هوازی و متحرک است که به عنوان غالب‌ترین گونه جنس *کمپیلوباکتر* دخیل در موارد پریودنتیت مطرح می‌باشد [1]. اگرچه اطلاعات موجود در ارتباط با مکانیسم‌های مولکولی و ویژگی‌های ژنتیکی این باکتری محدود است اما تعدادی از ژن‌های مسئول بیماری‌زایی در آن شناسایی شده‌اند؛ همچنین لایه سطحی **(S- layer)** از عوامل عمده ویرولانس باکتری محسوب می‌شود [2]. مطالعات جدید نشان می‌دهد که ژنی به نام ***ciaB***[6] محصولی را کد می‌کند که به عنوان یکی از عوامل حدت باکتری شناسایی شده است [3]. با توجه به اینکه بیماری پریودنتال شایع‌ترین بیماری در جوامع بشری می‌باشد و سلامت بافت‌های نگه دارنده دندان پیش نیاز درمان‌های دندان‌پزشکی است [4]، از طرفی نقش مهم و بالقوه باکتری *کمپیلوباکتر رکتوس* در بیماری‌های پریودنتال ثابت شده، بررسی فراوانی آلودگی به این باکتری می‌تواند نقش بالقوه‌ای در تصمیم‌گیری و برنامه‌ریزی درمانی برای بیماری‌های پریودنتال داشته باشد. در پژوهش‌های انجام شده در سال‌های گذشته عمدتاً از روش‌های مبتنی بر کشت استفاده شده و به کارگیری روش‌های مولکولی که از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بوده و باعث صرفه‌جویی در هزینه، زمان و نیروی انسانی می‌گردد، به میزان کمی صورت گرفته است [5]. با توجه به کمبود پیشینه تحقیقاتی مستند در زمینه نقش و فراوانی *کمپیلوباکتر*های دخیل در ضایعات پریودنتال در ایران هدف از تحقیق حاضر تشخیص مولکولی آلودگی به *کمپیلوباکتر رکتوس* در بیماران مراجعه کننده به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه تهران بود.

2- مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی-توصیفی در کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه تهران بر روی 40 بیمار زن و مرد مبتلا به پریودنتیت که از اوایل تیرماه تا پایان مهرماه سال 1393 به این مرکز مراجعه کرده بودند انجام شد، که 22 نفر مرد با میانگین سنی 37/09±11/48 و 18 نفر زن با میانگین سنی 45/22±10/44 وارد مطالعه شدند، پس از کسب رضایتنامه کتبی از آنها و ثبت اطلاعات مربوط به سن، جنس و بیماری‌های زمینه‌ای و... از روش کن کاغذی برای نمونه‌گیری از عمیق‌ترین پاکت پریودنتال (شیارلثه) استفاده شد. لازم به ذکر است قبل از قراردادن کن کاغذی بیمار جرم‌گیری نکرده بود و هیچ شستشوی دهانی و استفاده از مسواک نداشت، در این شرایط بعد از ارزیابی کلینیکی عمق شیارلثه با استفاده از پروب مدرج و تأیید آن توسط جراح، نمونه‌گیری انجام شد، در این روش کن کاغذی استریل با اندازه متوسط (به اندازه 40 یا 45، تی جی، آلمان) در عمیق‌ترین محل پاکت قرار گرفته و به

1. *Campylobacter rectus*
2. *Campylobacter gracilis*
3. *Campylobacter curvus*
4. *Campylobacter consisus*
5. *Campylobacter showae*
6. *Campylobacter Invasion antigen B*

مدت 15- 30 ثانیه در محل نگه داشته شد. کن‌های کاغذی فروبرده شده به میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری حاوی محلول فسفات بافرسالین به عنوان محیط انتقالی منتقل و طی فرایند زنجیره سرد، سریعاً به آزمایشگاه رسانده شده و در دمای 20- درجه سیلسیوس نگهداری شدند.

فرایند استخراج DNA: مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت استخراج DNA (DNP ™ محصول شرکت سیناژن) انجام شد.

بهینه‌سازی PCR: به این منظور در طی این مطالعه از DNA استخراج شده از سوش استاندارد باکتری *کمپیلوباکتر رکتوس* با شماره ATCC 32238 ارسالی از کشور ژاپن به عنوان کنترل مثبت و از پرایمرهای اختصاصی قطعه ژنی 16SrDNA استفاده شده است، این پرایمرها به صورت پودر لیوفیلیزه توسط شرکت تکاپوزیست سنتز و با افزودن مقادیر مشخص آب مقطر (96/1 میکرولیتر برای پرایمر فوروارد 104/3 میکرولیتر برای پرایمر ریورس) به غلظت 100 میکرو مولار رسانده شدند (محلول پایه)، سپس از این غلظت محلول کار با غلظت 10 میکرومولار تهیه شد، در روند بهینه‌سازی و انجام PCR در هر مرحله از بررسی نمونه‌ها، 1 میکرولیتر از این محلول کار به حجم واکنش اضافه گردید، بنابراین مولاریته پرایمرها در حجم نهایی (25 میکرولیتر) 0/4 میکرومولار و میزان هر یک 10 پیکومول بود. مشخصات پرایمرها در جدول 1ذکر گردیده است.

فرایند PCR: میزان مخلوط اصلی و سایر اجزای لازم برای PCR درجدول 2 ذکر گردیده است، و در هر نوبت از انجام PCR علاوه بر کنترل مثبت از اجزای PCR بدون الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شده است. واکنش PCR، با شرایط دمایی ذکر شده در جدول 3 در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem Veriti96well) در 35 سیکل انجام پذیرفت.

الکتروفورز محصولات PCR: در این مرحله 5 میکرولیتر از محصولات PCR بعد از مخلوط شدن با 1 میکرولیتر بافر بارگذاری داخل چاهک‌های ژل آگارز با غلظت 1/3% ریخته شده تحت ولتاژ 100 به مدت 30 دقیقه الکتروفورز گردیدند، پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی **با** DNA Safe Stain، مشاهده باندها توسط دستگاه UV Transilluminator، صورت گرفت.

آنالیزهای آماری: با استفاده از **نرم‌افزار** SPSS، و به کارگیری آزمون **t** و مربع کای اختلاف میزان آلودگی به باکتری و نیز عمق شیار لثه‌ای در دو جنس و نیز گروه-های سنی مختلف از نظر آماری بررسی شد.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده حضور *کمپیلوباکتر رکتوس* در ضایعات پریودنتال 18نفر (45% از بیماران) بود، درصد آلودگی در مردان 55% و در زنان 39% بود. علیرغم بالاتر بودن ظاهری درصد آلودگی در مردان نسبت به زنان، براساس نتایج بررسی‌های آماری صرفا بالاتر بودن میانگین عمق شیار لثه در زنان نسبت به مردان معنی‌دار بود ($P<0.05$) و اختلاف میزان آلودگی به باکتری در دو جنس و نیز میانگین عمق شیار لثه در گروه‌های سنی مختلف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$)**.** در این مطالعه بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن در دوجنس به 4 گروه سنی تقسیم‌بندی شدند. توزیع فراوانی بیماران مورد مطالعه در جنس‌ها و گروه‌های سنی مختلف در جدول 4 نمایش داده شده است.

جدول 1 مشخصات پرایمرها

پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه حاصل **از** PCR
PRIF	5′TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC3′	598bp
PRIR	5′TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT3′	

جدول 2 مقادیر لازم از هریک از اجزا برای واکنش PCR

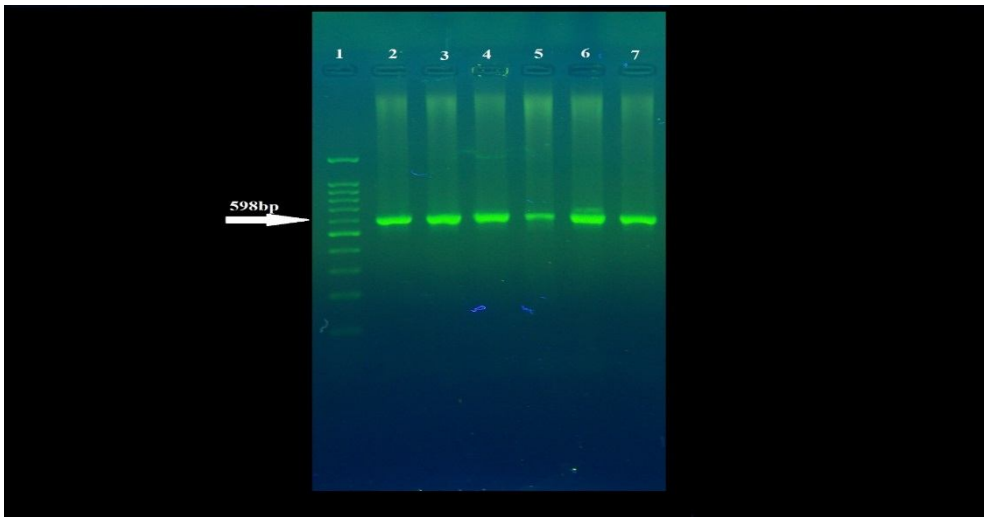
محلول	حجم مورد نیاز برای هر واکنش (µL)
Master Mix	12. 5
Forward primer	1(10mM)
Reverse primer	1(10mM)
Template DNA	5
Sterile Deionized Water	5. 5

نتایج الکتروفورز محصولات PCR در روند بهینه‌سازی (دماهای مختلف آنیلینگ یا اتصال) در شکل 1 نمایش داده شده است.

جدول 3 پروفایل حرارتی ترموسایکلر

مراحل	زمان	دما
Initial Denaturation	5min	95˚C
Denaturation	30sec	95˚C
Annealing	50sec	59˚C
Extension	80sec	72˚C
Final Extension	7min	72˚C

نتایج الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های بالینی (بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن) در شکل 2 نمایش داده شده است.

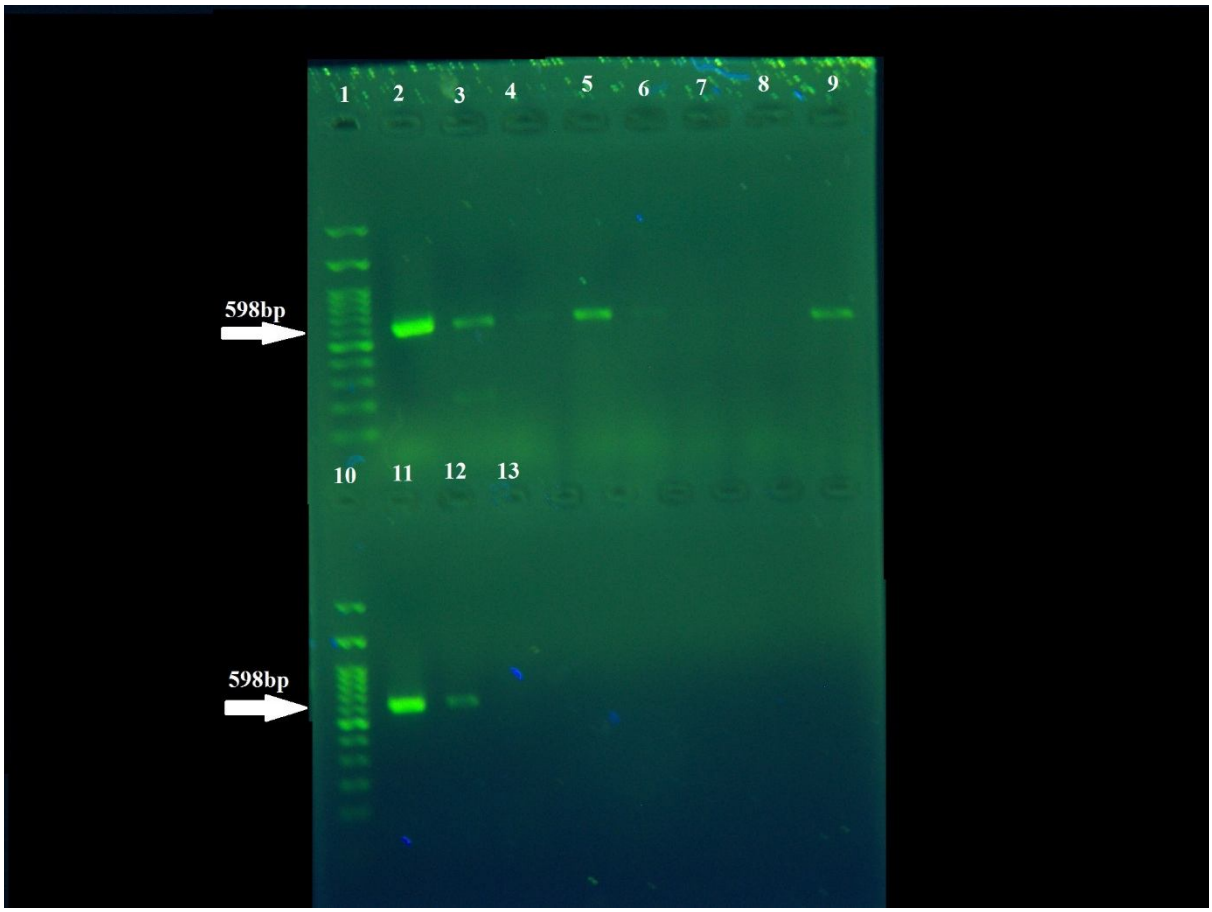


شکل 1 الکتروفورز محصولات PCR در روند بهینه‌سازی (دماهای مختلف اتصال)

چاهک 1: مارکر، چاهک2: دمای 49˚C، چاهک3: دمای 51˚C، چاهک 4: دمای 53˚ C، چاهک 5: دمای 55˚ C، چاهک 6: دمای 57˚C، چاهک 7: 59˚C.

جدول 4 توزیع فراوانی بیماران مورد مطالعه در جنس‌ها وگروه‌های سنی مختلف

جنس	تعداد		20-30	31-40	41-50	51-60	بالاتراز 60	جمع کل
زن	18	فراوانی	1	6	6	3	2	18
		درصد	%2/5	%15	%15	%7/5	%5	%45
مرد	22	فراوانی	8	8	3	2	1	22
		درصد	%20	%20	%7/5	%5	%2/5	%55
جمع کل	40	فراوانی	9	14	9	5	3	40
		درصد	%22/5	%35	%22/5	%12/5	%7/5	%100



شکل 2 الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های بالینی (بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن)

چاهک 1: مارکر، چاهک 2: نمونه کنترل مثبت *کمپیلوباکتر رکتوس*، چاهک‌ها به شماره‌های 12، 11، 9، 8، 7، 6، 5، 4، 3 نمونه‌های بالینی، چاهک‌ها به شماره 3، 4، 5، 6، 9، 11 و 12، نمونه‌های مثبت PCR بیماران، چاهک شماره 7 و 8 نمونه‌های منفی PCR بیماران، چاهک شماره 10: مارکر، چاهک شماره 13: نمونه کنترل منفی

3- بحث

کمپیلوباکتر رکتوس از عوامل مهم دخیل در موارد پریودنتیت در بسیاری از مناطق جهان می‌باشد، در مطالعات انجام شده در کشور برخلاف مطالعه حاضر بر ضرورت کشت و جداسازی و شناسایی باکتری‌ها تأکید شده است.

عبادیان و همکاران در سال 2012 مطالعه‌ای در مقایسه میزان شیوع باکتری‌ها در پریودنتیت مزمن (CP) و پری ایمپلنتیت (PI) بر روی 69 بیمارمراجعه کننده به کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه شهید بهشتی انجام دادند. نمونه‌گیری با استفاده از کن کاغذی و روش بررسی در این تحقیق DNA-DNA Hybridization بود. نتایج نشان داد پریودنتیت مزمن و پری ایمپلنتیت با باکتری‌های گرم منفی بی‌هوازی از جمله *کمپیلوباکتر رکتوس*، *فوزوباکتریوم نوکلاتوم*[7]، *پره وتلا اینترمدیا*[8] ارتباط دارد و شیوع گونه‌های بی‌هوازی از جمله *کمپیلوباکتر رکتوس* و*پره وتلا اینترمدیا* بیش از 50% بود که به ترتیب *کمپیلوباکتر رکتوس* در 59/1 % موارد پریودنتیت مزمن و در 15/4% ضایعات پری ایمپلنتیت حضور داشت [6]. علی‌رغم تفاوت روش مطالعه محققان فوق با مطالعه

7. *Fusobacterium nucleatum*
8. *Prevotella intermedia*

حاضر، نتایج مطالعه آنها نیز تأیید کننده غالب بودن گونه *کمپیلوباکتررکتوس* در بیماران مبتلا به پریودنتیت مزمن می‌باشد.

Siqueira و همکاران در 2003 در برزیل مطالعه‌ای با هدف بررسی وجود *کمپیلوباکتر گراسیلیس* و *رکتوس* در موارد درگیری ریشه با استفاده از روش‌های مبتنی **بر** PCR انجام دادند. نتایج نشان داد *کمپیلوباکتر گراسیلیس* و *رکتوس* به ترتیب در 21/4% و 30% از کانال‌های ریشه‌ای مرتبط با ضایعات مزمن وبدون علامت در 21/1 % و 23/3% از نمونه‌های گرفته شده با عفونت اولیه ریشه حضور داشته‌اند. یافته‌ها تایید کننده این ادعا بودند که هم *کمپیلوباکتر گراسیلیس* و هم *کمپیلوباکتر رکتوس* در عفونت‌های با منشا ریشه دخیل می‌باشند [7].

Ihara و همکاران در 2003 در ژاپن طی مطالعه‌ای به بررسی حضور *کمپیلوباکتر رکتوس* در ضایعات دندانی با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ پرداختند که توسط آنتی‌بادی CRT-2 موفق به تشخیص *کمپیلوباکتررکتوس* در میان 103 باکتری موجود در نمونه پلاک دندانی زیرلثه‌ای شدند و نتایج آنها نشان داد که حضور این باکتری در نمونه پلاک دندانی ارتباط معنی‌داری با عمق شیار لثه ($P<0.001$) و خونریزی لثه ($P<0.001$)، دارد. این یافته نشان می‌دهد که عفونت‌های *کمپیلوباکتر رکتوس* ممکن است شاخص مهمی برای بیماری‌های پریودنتال باشند [8].

Okada و همکاران در ژاپن در سال 2000 طی مطالعه‌ای با استفاده از روش PCR به بررسی 119 نمونه پلاک دندانی کودکان 2 تا 12 سال که با مسواک جمع‌آوری شده بود، پرداختند و نشان دادند که *کمپیلوباکتر رکتوس* شایع-ترین گونه بوده که در حفره دهانی و دندانی 100 % از کودکان شناسایی شده است [9].

Rams و همکاران در آمریکا در سال 1993 به بررسی حضور *کمپیلوباکتر رکتوس* در ضایعات پریودنتال پرداختند و با استفاده از کن کاغذی از این ضایعات نمونه‌گیری کرده و در محیط‌های کشت بر پایه بلاد آگاربه طور بی‌هوازی آنها را کشت دادند. در این تحقیق *کمپیلوباکتررکتوس* از80 % از 1654 بیمار جدا شد. بنا به اظهار این محققین اگرچه شیوع باکتری در دو جنس و گروه‌های سنی مختلف مشابه بوده ولی میزان جداسازی باکتری در محیط کشت با افزایش سن رابطه معکوس داشته است ($P<0.001$). با توجه به یافته‌های حاصل مشخص شد که *کمپیلوباکتر رکتوس* پاتوژنی بالقوه در پریودنتیت انسانی است [10].

Uematsu و همکارانش در ژاپن درسال 2011، 40 سویه غالب باکتریایی با ویژگی‌هایی شبیه *ویونلا* را از میان 422 جدایه از 7 پاکت پریودنتال جدا کرده و با روش PCR با استفاده از پرایمر ویژه توالی 16SrDNA و بررسی پروفایل پروتئینی سویه‌های مختلف با روش‌های SDS-PAGE و Western Blotting مورد بررسی قرار دادند. از میان 17 جدایه *کمپیلوباکتر*، (3%) 13 مورد *کمپیلوباکتر رکتوس* و (0/9%) 4 مورد *کمپیلوباکتر گراسیلیس* بودند [11].

کشت و جداسازی گونه‌های *کمپیلوباکتر* به ویژه *رکتوس* از نمونه‌های بالینی با دشواری‌های بسیاری همراه است. نتایج بررسی‌ها در مناطق مختلف جهان از جمله تحقیق Nonnenmacher و همکاران در سال 2001 در آلمان به ندرت با گزارشی از حضور *کمپیلوباکتر رکتوس* در میان سایر عوامل همراه بوده است، مطالعه آنها برروی 95 بیمار، 51 نفر زن و 44 نفر مرد با محدوده سنی 62- 14 سال با هدف بررسی شیوع میکروب‌های زیر لثه‌ای قابل کشت در بیماری‌های پریودنتال صورت گرفت و از روش‌های بیوشیمیایی متداول و نیز کیت تجاری تشخیص سریع میکروارگانیسم‌های بی هوازی بر اساس فعالیت‌های انزیمی استفاده شد که در یافته‌های حاصل از تحقیق فوق حضور *کمپیلوباکتر رکتوس* گزارش نگردید [12].

Castillo و همکاران در کلمبیا در سال 2011، تحقیقی با هدف تشخیص میکروارگانیسم‌های حاضر در نمونه‌های حاصل از بیماران درگیر باکتریمی، قبل و بعد از درمان پریودنتال انجام دادند. نمونه‌های خون محیطی از 42 بیمار با پریودنتیت مزمن یا پریودنتیت مهاجم جمع آوری شد. از هر بیمار 4 نمونه خون محیطی در زمان‌های مختلف قبل از درمان پریودنتال و بعد از آن گرفته شد. نمونه‌های خونی با روش nested PCR وکشت بی‌هوازی مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج نشان داد که درصد آلودگی نمونه‌های خون به کمپیلوباکتررکتوس در روش کشت بی‌هوازی 3درصد و در روش nested PCR 2درصد و در تلفیق دو روش 4درصد بوده است [13].

Macuchi و همکاران در سال 2000 در آمریکا با هدف شناسایی *کمپیلوباکتررکتوس* در افراد با پریودنتیت ابتدایی، افراد سالم و افراد مبتلا به التهاب لثه با روش SDS-PAGE به بررسی پروفایل پروتئین سلولی گونه‌های مختلف پرداختند که بر اساس نتایج حاصله فراوانی *کمپیلوباکتررکتوس* در حدی پایین‌تر از حد تشخیص در روش کشت غیر انتخابی (5-2درصد میکروبیوتای دهانی) بود [14] .

4- نتیجه‌گیری

با توجه به تفاوت نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان صورت گرفته می‌توان این نتیجه را گرفت که فراوانی موارد آلودگی و حضور معمول این باکتری در نمونه‌های پریودنتال متاثر از سن، جنس، تغذیه، نژاد، عوامل جغرافیایی، رعایت بهداشت و برخی بیماری‌های زمینه‌ای و سیستمیک می‌باشد. یافته‌های تحقیق حاضر به عنوان نخستین بررسی انجام شده در داخل کشور در زمینه میزان دخالت *کمپیلوباکترها* در موارد پریودنتیت ضمن تایید حضور *کمپیلو باکتر رکتوس* در درصد قابل توجهی از نمونه‌های مربوطه نشان داد که از روش PCR می‌توان به عنوان روشی سریع و آسان در تشخیص این باکتری در نمونه‌های بالینی بهره برد.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و سایر بررسی های به عمل امده، تلاش برای کشت و جداسازی باکتری علی‌رغم مشکلات موجود و نیز استفاده از روش‌های مولکولی جهت تشخیص کمی میزان باکتری در نمونه‌ها و بررسی حضور باکتری در جایگاه های مختلف محوطه دهانی در بیماران و جمعیت افراد سالم و گروه‌های مختلف سنی توصیه می‌شود.

5- تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از آقای دکتر میتسوگی اوکادا از بخش کودکان دانشکده دندان‌پزشکی کودکان هیروشیمای ژاپن که سوش استاندارد باکتری کمپیلوباکتررکتوس را برای ما ارسال نمودند. همچنین از همکاری و مساعدت مسئول بخش جراحی لثه کلینیک دندان‌پزشکی دانشگاه تهران (کلینیک بزرگمهر) و پرسنل محترم درمانگاه و به ویژه متخصصان محترم جراحی لثه آقای دکتر سید حسن دیباجی و خانم دکتر میترا کیانوش و آقای دکتر کاظم هاشمی قدردانی می‌شود. از همکاری آقای امیر بختیاری کارشناس محترم آزمایشگاه تحقیقاتی مولکولی واحد آزاد کرج نیز تشکر می‌شود.

6- منابع

[1] Arc RM, Diaz PI, Barros S, Galloway P, Bobetsis Y, Threadgill D, et al. Characterization of the invasive and inflammatory traits of oral *Campylobacter rectus* in a murine model of fetoplacental growth restriction and in trophoblast cultures. *J Reprod Immunol* 2010;84:145-53.

[2] Wang B, Kraig E, Kolodrubetz D. Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium-epithelial cell interactions. *J Infect and Immune* 2000;68:1465-73.

[3] Lagier MJ, Threadgill DS. Identification and

characterization of an invasion antigen B gene from the oral pathogen *Campylobacter rectus*. *Indian J Microbiol* 2014;54:33-40.

[4] Saebi Kh, Dowlatshahi M. Differential diagnosis of periodontal diseases. 1 ed. Tehran: Hayyan; 2000. p. 7-20. [In Persian]

[5] Rezaei F, Chalabi M, Moghim SH, Moghareh abed A, Faghri J. The prevalence of gram – negative anaerobic Bacteria in patients with chronic periodontitis. *Iranian journal YAFT-E* 2009;10:13-9. [In Persian]

[6] Ebadian AR, Kadkhodazadeh M, Zarnegarnia P, Dahlén G. Bacterial analysis of peri-implantitis and chronic periodontitis in Iranian subjects. *Acta Med Iran* 2012;50:486-92.

[7] Siqueira J, Rocas I. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2003;36:174-80.

[8] Ihara H, Miura T, Kato T, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, et al. Detection of *Campylobacter rectus* in periodontitis sites by monoclonal antibodies. *J Periodontal Res* 2003;38:64-72.

[9] Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* 2001;28:576-82.

[10] Rams T, Feik D, Slots J. *Campylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:230-5.

[11] Uematsu H, Nunez P, Sato N, Nakazawa F, Hoshino E. *Campylobacter rectus* and *Campylobacter gracilis* Isolated from Human Periodontal Pockets. *J Oral Biosci* 2011;53:356-65.

[12] Nonnenmacher C, Mutters R, Flores De Jacoby L. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:213-7.

[13] Castillo DM, Sánchez-Beltrán MC, Castellanos JE, Sanz I, Mayorga-Fayad I, Sanz M, et al. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol* 2011;38:418-27.

[14] Macuch P, Tanner A. *Campylobacter* species in health, gingivitis, and periodontitis. *J Dent Res* 2000;79:785-92.