

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ *PREVOTELLA INTERMEDIA* В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАРОДОНТИТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

А. В. Шибяева^{1,2}, Н. К. Аймадинова³, Е. В. Трубникова⁴, Т. В. Кузнецова², О. А. Зорина^{3,5}, Ю. К. Кудыкина⁶, А. Б. Шевелев^{2,6} ✉

¹ Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

² Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

⁴ Курский государственный университет, Курск

⁵ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва

⁶ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова РАМН, Москва

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием набора «Дентофлор» установлено, что пародонтопатоген *Prevotella intermedia* встречается у 55 % пациентов с хроническим пародонтитом. Это существенно ниже аналогичного показателя для *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola*. При этом гиперколонизация *P. intermedia* обнаружена только у 7,7 % пациентов контрольной группы. Это говорит о том, что гиперколонизация *P. intermedia* является значимым прогностическим признаком тяжести поражения пародонта. Патологический рост обсемененности *P. intermedia* редко протекает в форме моноинфекции: для этого вида больше, чем для других патогенов «красного комплекса», характерно сочетание с *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, приводящее к наиболее тяжелым формам хронического пародонтита. Для *P. intermedia*, в отличие от других патогенов «красного комплекса», не выявлено различий у мужчин и женщин по встречаемости и степени поражения пародонта при равной обсемененности.

Ключевые слова: микробиом, хронический пародонтит, полимеразная цепная реакция, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Борисович Шевелев
142782, Москва, пос. Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе; shevel_a@hotmail.com

Статья поступила: 13.09.2015 **Статья принята к печати:** 02.10.2015

A STUDY OF THE ROLE OF *PREVOTELLA INTERMEDIA* IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC PERIODONTITIS USING REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Shibaeva AV^{1,2}, Aymadinova NK³, Trubnikova EV⁴, Kuznetsova TV², Zorina OA^{3,5}, Kudykina YK⁶, Shevelev AB^{2,6} ✉

¹ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

² Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

³ The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow

⁴ Kursk State University, Kursk

⁵ Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Moscow

⁶ Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

In a real-time polymerase chain reaction-based assay with a Dentoflor kit *Prevotella intermedia*, a periodontal pathogen, was found to be present in 55 % of patients with chronic periodontitis. This percentage is significantly lower than the corresponding statistic for *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola*. In addition, hypercolonization of periodontium by *P. intermedia* was detected in 7.7 % of patients in the control group. This suggests that *P. intermedia* hypercolonization is an important prognostic factor indicating the severity of periodontal disease. The abnormal increase in *P. intermedia* is rarely a result of a monoinfection. Compared to other “red complex” pathogens, this species is more likely to co-occur with *P. gingivalis*, *T. forsythensis* and *T. denticola*, which leads to the most severe forms of chronic periodontitis. Unlike other “red complex” pathogens, *P. intermedia* showed no significant difference in occurrence and the degree of periodontal damage in male and female individuals with equal colonization levels.

Keywords: microbiome, chronic periodontitis, polymerase chain reaction, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksey Shevelev
27 km Kievskoe highway, Institute of Poliomyelitis village, Moscow, 142782; shevel_a@hotmail.com

Received: 13.09.2015 **Accepted:** 02.10.2015

В качестве основных причин развития пародонтита традиционно рассматриваются генетическая предрасположенность, влияние факторов среды (таких как уровень гигиены полости рта, диета, курение, наличие ортодонтических конструкций и др.), а также бактериальная инфекция. И если в патогенезе агрессивных форм пародонтита, как принято считать, ведущую роль играет генетическая составляющая [1], то основной причиной возникновения хронического пародонтита, по мнению большинства авторов, является именно инфицирование поверхности пародонта патогенными бактериями [2, 3]. В полости рта выявлено около 700 видов микроорганизмов, однако в качестве основных пародонтопатогенов называют, как правило, виды *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* [4–9].

В исследовании L. Ximenez-Fyvie и соавт. [10] виды *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola* предложено выделить в «красный комплекс» микроорганизмов, обладающих устойчивостью *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, в глубоких пародонтальных карманах отмечена повышенная обсемененность *Fusobacterium nucleatum*, представителями рода *Prevotella*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* и *Campylobacter rectus*, вероятно, участвующими в развитии бактериальной инфекции.

Виды рода *Prevotella* рассматриваются в качестве опасных пародонтопатогенов и в исследовании N. Suzuki и соавт. [9] наряду с *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* и *Treponema*. В ряде исследований [11, 12] приводятся факты выявления на пародонте здоровых людей опасных пародонтопатогенов, хотя степень обсемененности ими у здоровых лиц в среднем оказывалась существенно ниже, чем у пациентов с пародонтитом.

В связи с этим существует необходимость анализировать не столько качественные, сколько количественные соотношения бактерий в консорциумах пародонта. В исследовании K. Torrungruang и соавт. [13] впервые представлены статистически достоверные количественные данные о наличии пародонтопатогенов на пародонте здоровых лиц и пациентов с хроническим пародонтитом, полученные с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

При этом в отношении *P. intermedia* делается вывод о склонности этого патогена к коинфекции с *T. denticola*. В то же время сам вид *P. intermedia* представляется авторам менее значимым с точки зрения риска развития хронического пародонтита, чем *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

С учетом вышесказанного целью настоящего исследования было уточнение роли *P. intermedia* в качестве этиологического фактора хронического пародонтита на основании данных измерения количественной представленности этого микроорганизма у пациентов с хроническим пародонтитом и лиц контрольной группы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал был собран на базе Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Министерства здравоохранения РФ.

Все пациенты дали информированное согласие, в котором были подробно описаны условия участия в исследовании. Обследованы 153 пациента в возрасте от 16 до 70 лет без тяжелой соматической патологии. Основную группу составили 78 человек — пациенты с гингивитом ($n = 2$), хроническим пародонтитом легкой степени ($n = 12$), средней ($n = 37$) и тяжелой ($n = 27$), средний возраст — $42,6 \pm 11,3$ года. В контрольную группу вошли 75 человек (лица без признаков пародонтита), средний возраст — $27,7 \pm 10,8$ года.

В представленной выборке женщины составили 92 человека (41 пациентка с хроническим пародонтитом и 51 — контрольной группы), мужчины — 61 (основная группа — 34 пациента, контрольная — 27). Главным критерием для постановки диагноза «хронический генерализованный пародонтит» считали разрушение зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании оценки глубины пародонтальных карманов и выраженности деструкции костной ткани.

Содержимое пародонтальных карманов получали с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размером № 25), которые помещали в пробирку с реактивом «Проба-Рapid» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) объемом 0,5 мл. Клинический материал от каждого пациента собирали дважды.

Суммарную бактериальную ДНК пародонтального смыва пациентов выделяли с помощью набора реагентов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией. Препарат ДНК, соответствующий 1/10 объема одного смыва (50 мкл), растворяли в 50 мкл элюирующего раствора. В качестве матрицы для проведения одной ПЦР использовали 5 мкл полученного препарата.

В целях нормирования сигнала (учета разброса в количестве взятого биоматериала и эффективности экстракции ДНК) для каждого образца определяли величину «относительного Ct». Для этого из величины «абсолютного Ct» для специфического набора праймеров и зонда, усредненной по двум образцам одной серии, вычитали усредненную величину Ct общей бактериальной массы для тех же двух образцов серии. Статистической обработке подвергали данные, выраженные в форме «относительного Ct».

Для анализа данных применяли параметр «пороговой обсемененности» пародонта патогенами *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* и *T. denticola*, что позволяло отличить патологическую обсемененность ($\Delta Ct < 15$), способную служить причиной возникновения пародонтита, от нормальной ($\Delta Ct > 15$), встречающейся у лиц без выраженного поражения пародонта или склонности к нему. Данный подход к анализу результатов был рассмотрен в заявке на патент РФ № 2015120411 (Шибеева, Кудыкина, Трубникова и др. Способ оценки обсемененности пародонта патогенными бактериями с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 8.0 для Windows по стандартным методикам вариационной статистики для непараметрических данных, сравнение полученных величин осуществляли путем анализа параметров Манна–Уитни.

При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты сравнения полученных данных, нормированных на содержание общей 16S рДНК в образце, в виде параметра Ct были проанализированы с помощью критерия Манна–Уитни (в составе программы Statistica). Данный подход позволил выявить вклад каждого из патогенов в развитие патологии пародонта, а также исследовать склонность пародонтопатогенов к коинфекции. Была проверена гипотеза о наличии статистически значимых различий между основной и контрольной группами по представленности в консорциуме пародонта каждого из исследуемых видов патогенов. Анализ осуществляли во всей выборке (без разделения по полу), а также отдельно в выборке мужчин и в выборке женщин (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительный анализ основной и контрольной групп по встречаемости пародонтопатогенов с применением критерия Манна–Уитни

Микроорганизм	Суммарное значение ΔCt		U	Z	p	Количество человек	
	контрольная группа	основная группа				контрольная группа	основная группа
Вся выборка							
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	6030	5751	2901	0,09	>0,05	78	75
<i>P. gingivalis</i>	7667	4115	1265	6,2	<0,001	78	75
<i>P. intermedia</i>	7345	4437	1587	5,6	<0,001	78	75
<i>T. forsythensis</i>	8251	3531	681	8,3	<0,001	78	75
<i>T. denticola</i>	7868	3914	1064	7,2	<0,001	78	75
Мужчины							
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	880	1011	416	0,64	>0,05	27	34
<i>P. gingivalis</i>	1075	816	221	3,5	<0,001	27	34
<i>P. intermedia</i>	1063	828	233	3,6	<0,001	27	34
<i>T. forsythensis</i>	1206	685	90	5,4	<0,001	27	34
<i>T. denticola</i>	1142	750	155	4,7	<0,001	27	34
Женщины							
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	2373	1905	1044	0,012	>0,05	51	41
<i>P. gingivalis</i>	3041	1238	377	5,3	<0,001	51	41
<i>P. intermedia</i>	2817	1462	601	4,2	<0,001	51	41
<i>T. forsythensis</i>	3141	1138	277	6,1	<0,001	51	41
<i>T. denticola</i>	3017	1261	400	5,4	<0,001	51	41

Сравнительный анализ обеих групп показал наличие сильной связи между обсемененностью пародонта патогенами *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* и патологическим состоянием пародонта: значение параметра Z составляло 6,2; 5,6; 8,3; 7,2 соответственно. Только для такого опасного пародонтопатогена, как *A. actinomycetemcomitans*, не было выявлено разницы в значениях ΔCt в контрольной и основной группах. При сравнительном анализе полученных данных отдельно у мужчин и женщин отличий от результатов для всей выборки выявлено не было, однако ввиду дробления выборки на меньшие по размеру группы произошло снижение значений Z и p. Полученные результаты свидетельствуют, что *P. intermedia* нельзя назвать наиболее распространенным пародонтопатогеном. В контрольной группе патологическая обсемененность этим микроорганизмом зафиксирована только в 7,7 % случаев, а в основной группе пациентов — в 55 %. Для сравнения: пародонтопатогены «красного комплекса» обнаружены в существенно большем количестве случаев:

- *P. gingivalis*: норма — 33 %, патология — 76 %;
- *T. forsythensis*: норма — 40 %, патология — 95 %;
- *T. denticola*: норма — 19 %, патология — 76 %.

С учетом этого наблюдения вся исследуемая выборка вне зависимости от диагноза была разделена по признаку патологической обсемененности *P. intermedia*, т. е. в основную группу были отнесены пациенты со значением ΔCt <15 (патологический уровень обсемененности), в контрольную — с ΔCt >15 (допустимый уровень обсемененности). С помощью критерия Манна–Уитни была проверена гипотеза о наличии статистически значимых различий между группами по представленности каждого из исследуемых патогенов (табл. 2). Согласно полученным результатам патологическая обсемененность

пародонта *P. intermedia* имеет сильную связь с наличием в первую очередь *T. forsythensis* (Z = 6,5, p <0,001). Значимые корреляции отмечены также для *T. denticola* (Z = 6,0, p <0,001) и *P. gingivalis* (Z = 5,1, p <0,001). Патологическая обсемененность *P. intermedia*, как показало проведенное исследование, не коррелирует с *A. actinomycetemcomitans*.

Для установления парных корреляций между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами определяли коэффициент корреляции Спирмена. Исследование проводили для всей выборки (табл. 3), а также отдельно для контрольной группы (табл. 4) и группы пациентов с хроническим пародонтитом (табл. 5). Полученные результаты полностью подтвердили существенную роль *P. intermedia* в составе комплекса с *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola* в развитии пародонтита. Анализ всей выборки показал, что самая сильная связь наблюдается в отношении колонизации пародонта парой *T. forsythensis* / *T. denticola*.

Несколько меньшая, но высокая взаимосвязь выявлена в парах *P. gingivalis* / *T. forsythensis*, *P. intermedia* / *T. forsythensis*, *P. intermedia* / *T. denticola* и *P. gingivalis* / *T. denticola*. Связь средней силы получена для пары *P. gingivalis* / *P. intermedia*. Сходные корреляции наблюдались и при анализе пациентов основной группы с той лишь разницей, что значение коэффициента корреляции для пары *P. gingivalis* / *T. forsythensis* несколько больше, а для пары *P. gingivalis* / *P. intermedia* — меньше. При использовании корреляционного теста *A. actinomycetemcomitans* не проявил склонности к коинфекции с пародонтопатогенами «красного комплекса». Напротив, при анализе данных контрольной группы прослеживалась слабая тенденция к конкуренции между ним и другими патогенами: *P. gingivalis* и *T. denticola*.

Таблица 2. Сравнительный анализ групп пациентов с патологической обсемененностью пародонта *P. intermedia* (ΔCt <15) и без нее (ΔCt >15) по встречаемости других пародонтопатогенов с применением критерия Манна–Уитни

Микроорганизм	Суммарное значение ΔCt		U	Z	p	Количество человек	
	ΔCt <i>P. intermedia</i> <15	ΔCt <i>P. intermedia</i> >15				ΔCt <i>P. intermedia</i> <15	ΔCt <i>P. intermedia</i> >15
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	3913	7868	2408	0,56	>0,05	49	104
<i>P. gingivalis</i>	2486	9295	1261	-5,1	<0,001	49	104
<i>T. forsythensis</i>	2133	9648	908	-6,5	<0,001	49	104
<i>T. denticola</i>	2335	9447	1110	-6,0	<0,001	49	104

Таблица 3. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе общей выборки пациентов

Микроорганизм	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	Значение p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	
<i>P. gingivalis</i>	0,14		<0,001	<0,001	<0,001	
<i>P. intermedia</i>	-0,061	0,36		<0,001	<0,001	
<i>T. forsythensis</i>	-0,054	0,51	0,48		<0,001	
<i>T. denticola</i>	-0,0077	0,46	0,46	0,6		
Коэффициент Спирмена						

Таблица 4. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе контрольной группы

Микроорганизм	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	Значение p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		<0,01	>0,05	>0,1	<0,01	
<i>P. gingivalis</i>	0,36		>0,05	>0,05	>0,05	
<i>P. intermedia</i>	-0,065	-0,03		>0,05	>0,05	
<i>T. forsythensis</i>	0,037	0,017	0,16		<0,05	
<i>T. denticola</i>	0,3	0,12	0,054	0,24		
Коэффициент Спирмена						

Таблица 5. Взаимосвязь между гиперколонизацией пародонта *P. intermedia* и другими патогенами при анализе группы пациентов с хроническим пародонтитом

Микроорганизм	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	Значение p
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		>0,1	>0,1	<0,05	<0,05	
<i>P. gingivalis</i>	0,0059		<0,01	<0,001	<0,001	
<i>P. intermedia</i>	-0,11	0,3		<0,05	<0,001	
<i>T. forsythensis</i>	-0,19	0,48	0,26		<0,001	
<i>T. denticola</i>	-0,22	0,31	0,33	0,39		
Коэффициент Спирмена						

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение критерия Манна–Уитни позволило подтвердить существенное влияние пародонтопатогенов «красного комплекса» — *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* — на развитие хронического пародонтита. Однако достоверность различий между основной и контрольной группами, полученных для *P. intermedia*, оказалась ниже, чем для остальных пародонтопатогенов. Это, вероятно, связано с относительной редкостью *P. intermedia* у пациентов (7,7 % — в случае нормы, 55 % — в случае патологии). Более того, не было зафиксировано ни одного случая заболевания пародонтитом, при котором наблюдалась бы патологическая обсемененность *P. intermedia* без одновременной патологической колонизации пародонта каким-либо патогеном «красного комплекса».

Таким образом, применительно к *P. intermedia* невозможно говорить о ее поведении при моноинфекции, в отличие, например, от *P. gingivalis*. Подтверждение этого факта было получено при разделении выборки по признаку наличия/отсутствия патологической обсемененности пародонта *P. intermedia*.

При этом была выявлена выраженная тенденция к формированию комплекса этого патогена с *T. forsythensis*, а также с *T. denticola* и *P. gingivalis*. Эти результаты полностью

подтвердились и при исследовании корреляций по методу Спирмена: патологическая обсемененность *P. intermedia* показывает связь высокой силы с наличием на пародонте комплекса *T. forsythensis* / *T. denticola*, в то время как корреляция с гиперколонизацией пародонта *P. gingivalis* заметно слабее.

ВЫВОДЫ

Можно утверждать, что *P. intermedia* является достаточно опасным пародонтопатогеном. Обнаружение этого микроорганизма на пародонте с высокой долей вероятности позволяет прогнозировать тяжелое течение хронического пародонтита. Это заключение дает основание рассматривать уровень колонизации пародонта *P. intermedia* как важный диагностический критерий. При этом *P. intermedia* не выступает в роли инициатора патологических процессов, но вносит значительный вклад в развитие сочетанной инфекции пародонта, участвуя в коинфекции с комплексом *T. forsythensis* / *T. denticola*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (гос. задание № 19.1724.2014/К в сфере научной деятельности).

Литература

1. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. J Periodontol. 1994; 65: 479–488.
2. Page RC. Critical issues in periodontal research. J Dent Res. 1995; 74: 1118–1128.
3. Tanner ACR, Kent R Jr., Dyke Van T, Sonis ST, Murray LA. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. J Periodontol. 2005; 76 (4): 573–581.
4. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. J Periodontol. 2008; 79 (9): 1620–9.
5. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol. 2005; 32 (8): 860–6.
6. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braido GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.

2013; 32 (12): 1501–9.

7. Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009; 15 (4): 195–204.
8. Heasman PA, Hughes FJ. Drugs, medications, and periodontal disease. *Br Dent J.* 2014; 217 (8): 411–9.
9. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int J Dent.* 2013; 2013: 587279–85.
10. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648–657.
11. Gmur R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque a natural

References

1. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol.* 1994; 65: 479–488.
2. Page RC. Critical issues in periodontal research. *J Dent Res.* 1995; 74: 1118–1128.
3. Tanner ACR, Kent R Jr., Dyke Van T, Sonis ST, Murray LA. Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol.* 2005; 76 (4): 573–581.
4. Atieh MA. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2008; 79 (9): 1620–9.
5. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (8): 860–6.
6. Finoti LS, Anovazzi G, Pigossi SC, Corbi SC, Teixeira SR, Braidó GV, et al. Periodontopathogens levels and clinical response to periodontal therapy in individuals with the interleukin-4 haplotype associated with susceptibility to chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32 (12): 1501–9.
7. Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009; 15 (4): 195–204.

habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res.* 1994; 73 (8): 1421–8.

12. Lai H, Horita A, Chou CK, Guy AW. A review of microwave irradiation and actions of psychoactive drugs. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 1987; 6 (1): 31–6.
13. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* co-infection areas associated with severe periodontitis in a Thai population. *PLoS One.* 2015; 10 (8): 0136646.

8. Heasman PA, Hughes FJ. Drugs, medications, and periodontal disease. *Br Dent J.* 2014; 217 (8): 411–9.
9. Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int J Dent.* 2013; 2013: 587279–85.
10. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648–657.
11. Gmur R, Guggenheim B. Interdental supragingival plaque a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res.* 1994; 73 (8): 1421–8.
12. Lai H, Horita A, Chou CK, Guy AW. A review of microwave irradiation and actions of psychoactive drugs. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 1987; 6 (1): 31–6.
13. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola* / *Prevotella intermedia* co-infection areas associated with severe periodontitis in a Thai population. *PLoS One.* 2015; 10 (8): 0136646.