

[文章编号] 1000-1182(2007)05-0470-04

## 慢性牙周炎龈下菌斑中五种牙周可疑致病微生物的分布

周 婷<sup>1,2</sup>, 徐 屹<sup>3</sup>, 丁 一<sup>3</sup>, 赵 寰<sup>3</sup>

(1.重庆医科大学附属口腔医院 口腔内科, 重庆 400015;

2.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 3.四川大学华西口腔医院 牙周科, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 研究五种牙周可疑致病微生物在慢性牙周炎患者龈下菌斑的分布。方法 选择27例慢性牙周炎患者, 每位患者选取牙周袋最深的两个位点作为观察位点, 采集龈下微生物样本, 采用多重聚合酶链反应和反杂交的方法对伴放线菌嗜血菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、中间普雷沃菌和齿垢密螺旋体五种微生物进行半定量检测。结果 在所检测的54个位点中, 牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌、福赛斯坦纳菌和齿垢密螺旋体均有较高的检出率, 分别为98.15%、92.59%、100%和98.15%; 伴放线菌嗜血菌检出率较低, 为20.37%。牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌的检出量明显高于其他三种微生物, 其差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 慢性牙周炎患者多存在牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌、中间普雷沃菌和齿垢密螺旋体的同时感染, 且牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌的感染量较高。

**[关键词]** 慢性牙周炎; 牙周致病菌; 聚合酶链反应

**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A

Distribution of five periodontal pathogens in subgingival plaque in chronic periodontitis ZHOU Ting<sup>1,2</sup>, XU Yi<sup>3</sup>, DING Yi<sup>3</sup>, ZHAO Huan<sup>3</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, Stomatological College of Chongqing University, Chongqing 400015, China; 2. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** Objective To investigate the distribution of *H. actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* and *T. denticola* in the subgingival plaque in the patients with chronic periodontitis. Methods 27 patients with chronic periodontitis were included. Two of the deepest pockets of each patient were selected as the study sites. Semi-quantification of subgingival microorganism samples was analyzed by multiplex polymerase chain reaction and reverse hybridization assay. Results *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* and *T. denticola* were detected in a high proportion of examined sites (corresponding values were 98.15%, 92.59%, 100% and 98.15%), however, the proportion of *H. actinomycescomitans* was low (20.37%). The levels of *P. gingivalis* and *T. forsythensis* were higher than the other three microorganisms with statistical significance. Conclusion The simultaneous infection of *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia* and *T. denticola* is found in the patients with chronic periodontitis, in which the levels of *P. gingivalis* and *T. forsythensis* are higher than the other two microorganisms.

**[Key words]** chronic periodontitis; periodontal pathogens; polymerase chain reaction

病因学研究认为, 菌斑是牙周炎的始动因子, 其中龈下菌斑是影响牙周炎发生发展的主要危险因素。龈下菌斑组成复杂, 种类繁多, 目前认为有20~25种微生物与慢性牙周炎发生发展有关, 其中

伴放线菌嗜血菌(*Haemophilus actinomycescomitans*, *H. actinomycescomitans*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythensis*, *T. forsythensis*)、中间普雷沃菌(*Prevotella intermedia*, *P. intermedia*)、直形弯曲菌(*Campylobacter rectus*, *C. rectus*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*)以及齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*, *T. denticola*)等

[收稿日期] 2007-03-06; [修回日期] 2007-06-12

[作者简介] 周 婷(1980-), 女, 贵州人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 徐 屹, Tel: 028-85501439

与慢性牙周炎的关系最为密切。但是,由于研究方法的差异,目前对牙周炎患者龈下菌斑中微生物组成报道不一,特别是对*T. forsythensis*和*T. denticola*等实验室培养有一定难度的微生物缺乏研究,对*H. actinomycetemcomitans*的分布情况则存在争议。本实验采用多重聚合酶链反应(multiplex polymerase chain reaction, multi-PCR)和反杂交技术,半定量检测中国中重度慢性牙周炎患者同一龈下菌斑中*H. actinomycetemcomitans*、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*T. forsythensis*和*T. denticola*五种微生物的分布情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象的选择

选择于2004年7—10月在四川大学华西口腔医院牙周科就诊并志愿参加本实验的慢性牙周炎患者27例作为研究对象,其中男性12例,女性15例;年龄28—53岁,平均43.6岁。每个患者至少有20颗天然牙,至少有两颗牙的牙周袋深度超过4 mm,要求3个月内未接受过牙周治疗或至少1个月内未服用过抗生素;无任何影响牙周炎进程或治疗的全身性疾病;妇女无妊娠。

### 1.2 临床指标检测

对患者的全口牙周状况进行全面检查后,选择两个牙周袋较深的位点作为检测位点,所选位点不在同一象限。检查两个位点的牙周探诊深度(probing pocket depth, PPD)、临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL)和探诊出血(bleeding on probing, BOP)。

### 1.3 微生物学检测

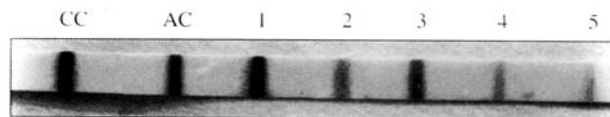
1.3.1 微生物样本采集 于检测位点处收集龈下菌斑样本,用手工刮治器先去除龈上菌斑及牙石,隔湿,先后用两根40号无菌纸尖插入牙周袋底,各停留20 s取出,放入无菌的1.5 mL Eppendorf管中, -20℃保存,备用。

1.3.2 DNA提取、multi-PCR和反杂交 利用试剂盒High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics Mannheim公司,德国)提取DNA。PCR扩增反应体系包括5  $\mu$ L PCR缓冲液、5  $\mu$ L 25 mmol/L  $MgCl_2$ 、1  $\mu$ L Taq酶、35  $\mu$ L引物和dNTP的混合物(Hain Diagnostik GmbH公司,德国)、5  $\mu$ L样本DNA。阴性对照则加入5  $\mu$ L无菌双蒸水。PCR反应条件:预变性95℃ 5 min;变性95℃ 30 s, 58℃ 2 min, 10个循环;变性95℃ 25 s, 退火53℃ 40 s, 延伸70℃ 40 s, 20个循环;延伸70℃ 8 min。

将PCR扩增产物用microDent® kit(Hain Diagnostik GmbH公司,德国)进行反杂交:将已标记生

物素的PCR扩增产物变性解链,加入杂交液,45℃下与已固定有两个阳性对照带(PCR阳性对照和杂交的阳性对照)和五个牙周致病微生物特异DNA探针的硝酸纤维素膜孵育30 min。当样本中的牙周致病微生物PCR扩增产物和与之互补的特异DNA探针结合后,洗涤去除与探针非特异结合的DNA。加入细菌蛋白-碱性磷酸酶复合物及其底物,使特异结合在硝酸纤维素膜上,生物素标记的牙周致病菌PCR扩增产物显紫蓝色。

检测结果根据杂交带上探针的不同位置区分细菌种类,染色带的深浅代表细菌量的差异,分为四个等级(图1):+++ (颜色与阳性对照带一致),++ (介于+++与+之间),+ (弱显色),- (未见显色)。由同一观察者区分等级,对受检样本进行半定量分析。



CC: 杂交反应阳性对照带; AC: PCR扩增反应阳性对照带; 1: *H. actinomycetemcomitans* (+++); 2: *P. gingivalis* (+); 3: *P. intermedia* (++); 4: *T. forsythensis* (+); 5: *T. denticola* (+)

图1 临床标本杂交强度

Fig 1 Hybridization outcome of one clinical sample

### 1.4 统计学分析

使用SPSS 11.0统计软件对结果进行统计分析。以位点为统计对象,微生物检出量按+++、++、+、-四个等级区分,采用非参数检验的Mann-Whitney U检验进行比较,检验水准为双侧  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

经临床检测,27例慢性牙周炎患者54个受检位点的PPD为( $6.76 \pm 1.68$ ) mm, CAL为( $6.98 \pm 1.78$ ) mm, BOP阳性率为96.30% (52/54)。

五种微生物的位点检出率和个体检出率见表1。除*H. actinomycetemcomitans*外,其余四种微生物都有较高的位点和个体检出率。

表1 五种微生物的检出率

Tab 1 Periodontal occurrence of five microorganisms

微生物种类	阳性 位点数	位点 检出率(%)	个体 检出率(%)
伴放线菌嗜血菌	11	20.37	25.93
牙龈卟啉单胞菌	53	98.15	100
中间普雷沃菌	50	92.59	96.30
福赛斯坦纳菌	54	100	100
齿垢螺螺旋体	53	98.15	100

五种微生物不同检出水平的分布见表2。由表2可见,*P. gingivalis*、*T. forsythensis*检出量明显高于其他三种细菌,其差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表2 五种微生物不同检出水平的分布(位点数)

Tab 2 Distribution of different levels of five microorganism's numbers of examined site

微生物种类	+++	++	+	-	合计
伴放线菌嗜血菌	1	4	6	43	54
牙龈卟啉单胞菌	11	27	15	1	54
中间普雷沃菌	9	10	31	4	54
福赛斯坦纳菌	23	17	14	0	54
齿垢密螺旋体	0	15	38	1	54

### 3 讨论

PCR方法具有特异性高、敏感性强的特点,对于培养条件要求苛刻的厌氧菌可以避免假阴性结果。Ashimoto等<sup>[1]</sup>分别采用培养法和PCR法检测龈下细菌,结果表明检出*T. forsythensis*和*H. actinomycescomitans*的符合度分别为28%和71%,大部分培养法的阴性位点用PCR方法检测均为阳性。Riggio等<sup>[2]</sup>采用培养法检测牙周炎患者*H. actinomycescomitans*和*P. gingivalis*的检出率分别为15%和11%,而采用PCR方法的检出率均达到40%。本研究采用多重PCR方法,在同一反应体系中一次快速检测出*H. actinomycescomitans*、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*T. forsythensis*和*T. denticola*五种微生物。Eick等<sup>[3]</sup>曾将该方法与传统的细菌培养法进行比较,发现该方法对这五种微生物的检测都有较高的特异度和敏感度,*P. gingivalis*和*T. forsythensis*的检出率均高于培养法。

*H. actinomycescomitans*、*P. gingivalis*、*P. intermedia*、*T. forsythensis*和*T. denticola*五种微生物的检出率在不同报道中不尽相同。*H. actinomycescomitans*检出率差别较大,Doungudomdacha等<sup>[4]</sup>对50例慢性牙周炎患者的位点检出率高达91.8%,而Darby等<sup>[5]</sup>在33例重度牙周炎中的检出率只有3%。不同种族的龈下细菌的组成有差异,Choi等<sup>[6]</sup>在29例韩国重度牙周炎患者中检出*H. actinomycescomitans*的占89.7%,Fujise等<sup>[7]</sup>在日本人中的检出率则为40%。在对中国人的研究中,Tan等<sup>[8]</sup>和Mombelli等<sup>[9]</sup>报道的检出率分别为69%和63%,并发现牙周炎患者和健康人之间的检出率并无差异,认为*H. actinomycescomitans*是中国人龈下菌斑的正常组成部分。本研究结果显示,*H. actinomycescomitans*的位点检出率为20.37%,个体检出率为25.93%,该结果与上述对中国人群的研究有一定差异,笔者分析可能与研究对象的样本量、牙周炎类型、炎症程度、检测方法等有关。为了取得*H. actinomycescomitans*在中国人龈下菌斑中分布的准确结果,还应采用敏感

性和特异性高的方法,扩大样本量,采用统一的牙周炎分类标准,并按炎症程度分层进行研究。

本研究结果显示,*P. gingivalis*、*T. forsythensis*、*P. intermedia*和*T. denticola*的检出率都很高,与多数研究结果接近<sup>[10]</sup>。据报道*P. gingivalis*和*T. forsythensis*的检出率分别为78%~100%和82%~100%。对中国慢性牙周炎患者的研究中,王者玲等<sup>[11]</sup>在牙周炎活动位点*P. gingivalis*的检出率为86%,*T. forsythensis*为95%,*T. denticola*为86%,*P. intermedia*为95%。钟晓波等<sup>[12]</sup>研究发现*T. denticola*和*T. forsythensis*的检出率分别为82.0%和98.0%,且*T. denticola*和*T. forsythensis*在重度牙周炎和牙周炎活动期的病例中的检出率为100%。由此可见以上四种微生物与中重度慢性牙周炎有密切关系。

本研究对微生物检出量的半定量分析显示,中重度慢性牙周炎龈下菌斑中*P. gingivalis*和*T. forsythensis*的量明显高于*H. actinomycescomitans*、*P. intermedia*和*T. denticola*( $P<0.05$ ),提示*P. gingivalis*和*T. forsythensis*在中国人中重度牙周炎的发生发展中具有重要地位。龈下细菌中*P. gingivalis*与*T. forsythensis*关系密切。Socransky等<sup>[13]</sup>认为*P. gingivalis*、*T. forsythensis*和*T. denticola*是紧密联系的复合体,与牙周袋深度和探诊出血有相关性,也与牙周炎的进展密切相关。Papapanou等<sup>[14]</sup>显示,*P. gingivalis*、*T. forsythensis*和*T. denticola*的数量在深牙周袋和牙周炎进展位点都有明显增加。

本研究通过对慢性牙周炎患者龈下菌斑进行检测,结果表明慢性牙周炎患者普遍存在*P. gingivalis*、*T. forsythensis*、*P. intermedia*和*T. denticola*感染,且*P. gingivalis*和*T. forsythensis*的水平较高。

### [参考文献]

- [1] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions[J]. Oral Microbiol Immunol, 1996, 11(4): 266-273.
- [2] Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, et al. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples[J]. J Periodontol Res, 1996, 31(7): 496-501.
- [3] Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples[J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(7): 638-644.
- [4] Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, et al. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycescomitans* at adult periodontitis sites



- [J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(5):437-445.
- [5] Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, et al. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction[J]. J Clin Periodontol, 2000, 27(6):417-424.
- [6] Choi BK, Park SH, Yoo YJ, et al. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach[J]. J Periodontol, 2000, 71(9):1387-1394.
- [7] Fujise O, Hamachi T, Inoue K, et al. Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy[J]. J Periodontol, 2002, 73(11):1253-1259.
- [8] Tan KS, Woo CH, Ong G, et al. Prevalence of Actinobacillus actinomycetemcomitans in an ethnic adult Chinese population[J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(9):886-890.
- [9] Mombelli A, Gmür R, Lang NP, et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus[J]. J Clin Periodontol, 1999, 26(8):505-510.
- [10] 张贤华, 张 斌, 吴织芬. 3种寡核苷酸探针针对龈下菌斑中牙周致病菌的检测[J]. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(4):287-288, 310.
- ZHANG Xian-hua, ZHANG Bin, WU Zhi-fen. Distribution of 3 kinds of periodontal pathogens in subgingival plaques patients with chronic periodontitis[J]. West China J Stomatol, 2003, 21(4):287-288, 310.
- [11] 王者玲, 岗本公彰, 杨圣辉, 等. PCR直接检测龈下菌斑主要可疑牙周致病菌[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(2):115-116.
- WANG Zhe-ling, OKAMOTO Masaaki, YANG Sheng-hui, et al. Detection of main putative periodontopathic bacteria in subgingival plaque by polymerase chain reaction[J]. Chinese J Microecology, 2003, 15(2):115-116.
- [12] 钟晓波, 黄定明, 苏 伟, 等. PCR对牙周难分离培养可疑致病菌的分布情况检测[J]. 中华医学研究杂志, 2003, 3(4):307-309.
- ZHONG Xiao-bo, HUANG Ding-ming, SU Wei, et al. Molecular detection of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of periodontitis lesions[J]. J Chinese Medicine Research, 2003, 3(4):307-309.
- [13] Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. J Clin Periodontol, 1998, 25(2):134-144.
- [14] Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, et al. Subgingival microbiota in adult Chinese: Prevalence and relation to periodontal disease progression[J]. J Periodontol, 1997, 68(7):651-666.
- (本文编辑 吴爱华)

## 口腔外科新利器——赛特力公司超声骨刀

赛特力公司——压电陶瓷超声发生器的发明者,最新推出了用于口腔外科的超声设备:Piezotome™超声骨刀。注册证号:国食药监械(进)字2007第2230109号。

对于牙槽骨严重缺失的患者,治疗时必须采用多种骨充填手术。Piezotome超声骨刀可用于骨切开术、骨整形术、骨嵴扩张、韧带切开术或上颌窦提升术等棘手的手术。

与手动或电动设备相比,临床医师使用超声设备会更舒适、更安全。使用Piezotome超声骨刀,可以毫不费力地进行精细的切割手术并且不会损伤软组织。术后疼痛轻微,愈合迅速。而且,不用十分费力,即可获得清晰的切割刀口。

由于选定的频率在28-32 kHz之间,所以Piezotome超声骨刀只对硬组织有效,从而降低了软组织受损的危险。发生器间歇产生低幅值超声波振动,这种经调谐的超声切割可使组织放松并使其微结构得到最佳的修复,因而切割创面清晰整齐,有利于创口更好地愈合。

超声骨刀的工作尖坚固耐用,且振幅受到控制,因而切割精度非常高。另外,手柄操纵非常灵活、工作尖的设计符合解剖形态,所以易于进行棘手的手术。

Piezotome超声骨刀还对切割表面有止血作用。超声空化作用可以限制血液渗出且利于从工作区清除骨屑,使医生能非常清楚地看到手术区,并可避免可能导致组织退化的术区温度升高。

得益于最尖端的双向动力超声发生器SP Newtron®技术的推动, Piezotome超声骨刀有如下出众的特性:1)实时自动频率调节,可有效地感知手术操作;2)推拉电路,功率强大并可准确连续控制工作尖振幅以保护脆弱的组织;3)反馈机制,让使用和操作更轻松、精确。以上3个特点构成了巡航控制系统™,使临床医师可轻松控制局面,确保手术绝对安全。

Piezotome超声骨刀及其外设符合严格的安全和卫生要求:1)带有一体盒的一次性使用无菌冲洗管;2)连线和手柄可消毒;3)机体光滑易清洁,无粗糙的边缘;4)有多功能脚踏开关控制(在手术过程中无需触摸控制面板)。

Piezotome超声骨刀是进行预种植手术(骨切开术、上颌窦提升、拔牙)时的首选工具,此外还可用于传统的超声治疗。本设备不但可以使用预种植外科手术所用的所有工作刀,而且可以使用传统超声治疗领域的近80多个赛特力工作尖。这些治疗领域包括:1)牙周病:牙周袋清创、牙根表面修整和肉芽组织清除、种植体保养;2)牙髓病:根管荡洗、根管充填、根管再治疗;3)牙体预防:牙间隙洁治、龈上和龈下治疗和色素去除;4)修复治疗:嵌体/牙冠戴入、松动修复体。

Piezotome超声骨刀——口腔外科手术成功和安全的保证。

更详尽的产品信息请咨询法国艾龙集团北京办事处(原法国赛特力-碧兰公司)。电话:86-10-64657011/2/3/4;电子邮件:beijing@cn.acteongroup.com;网站:www.cn.acteongroup.com。