

感染根管中产黑色素杆菌检测率的影响因素

漆正楠综述 唐子圣 刘正审校

(上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓病科; 上海市口腔医学重点实验室 上海 200011)

[摘要] 产黑色素杆菌与感染根管密切相关, 但各项研究得出的检测率存在一定差异。本文通过对国内外诸多文献中的试验数据进行比较, 分析了影响感染根管中产黑色素杆菌检测率的主要因素, 其中包括样本量、样本来源地区、取样部位、患者的临床症状和检测方法, 希望将来能通过控制影响因素更全面地评价该细菌在根尖周感染中所占的地位。

[关键词] 产黑色素杆菌; 感染根管; 检测率

[中图分类号] R 780.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.02.019

Influential factor of black-pigmented bacteria detection rate in infected root canal *QI Zheng-nan, TANG Zi-sheng, LIU Zheng. (Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, The Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)*

[Abstract] Black-pigmented bacteria have close relationship with infected root canals, but there are some differences in detection rate. The purpose of this study is to analyze the main factors influencing the detection of these bacteria in infected root canals by comparing the results from a large number of domestic and foreign literatures, which include the sample size, the geographical difference, the sampling site, the clinical symptoms and the detection methods. We hope to find out the specific role of these bacteria in infected root canals by controlling the influential factors in the future.

[Key words] black-pigmented bacteria; infected root canal; detection rate

产黑色素杆菌 (black-pigmented bacteria, BPB) 是一类革兰阴性专性厌氧菌, 具有多态性、无动性、无芽孢等特点, 能产生脂多糖、胰蛋白酶和胶原酶等众多致病因子, 与感染根管和牙周炎等疾病密切相关^[1-4]。BPB 在感染根管中的检测率可达 50% 以上, 主要为牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌^[1,3-4]。迄今已获得了这些细菌在感染根管中的具体检测率, 但各种研究的数据不尽相同。

1 样本量

2007 年, Tomazinho 等^[3]对 100 例感染根管样本作了检测, BPB 的检测率达 60%, 与 Siqueira

等^[5]以 54 例感染根管样本检测所得结果 (59%) 接近。但 Vianna 等^[6]在对 20 例感染根管样本所作的检测中, BPB 的检测率仅为 20%; Siqueira 等^[7]通过 23 例感染根管样本得出的检测率为 22%。虽然不能排除上述研究中试验方法、取样部位和样本地区选择等等对结果带来的影响, 但是根据统计学理论, 样本量仍然是造成差异的一个不可忽略的因素。

2 样本来源地区

2004 年, Baumgartner 等^[8]分别对来自美国俄勒冈州的波特兰以及巴西里约热内卢的根尖周脓肿样本进行了 PCR 分析 (表 1), 结果美国样本中的牙龈卟啉单胞菌、中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌的检测率明显高于巴西样本。导致这种地区差异的原因有气候、饮食习惯和经济环境等多种因素, 而且不同的种族, 口腔中的细菌组成比也有所不同^[8-9]; 因此, 样本来源地区不同, 可能是造成检测率差异的原因之一。

[收稿日期] 2010-07-29; **[修回日期]** 2011-01-04

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划基金资助项目 (2007CB-936004); 上海交通大学校科研基金资助项目 (2008XJ028); 上海交通大学“医工(理)交叉研究”基金资助项目 (YG2010MS61)

[作者简介] 漆正楠 (1987—), 女, 上海人, 硕士

[通讯作者] 唐子圣, Tel: 021-23271699-5701

表 1 不同地区的产黑色素杆菌检测率比较
Tab 1 Comparison of BPB detection rate from different regions %

菌种	美国	巴西
牙龈卟啉单胞菌	72	30
牙髓卟啉单胞菌	56	56
中间普雷沃菌	85	41
变黑普雷沃菌	36	7

3 取样部位

目前, 大部分试验都采取无菌纸尖采样法, 取完整根管内的组织液作为样本; 然而, Siqueira 等^[7]认为应该把取样范围缩小至根尖 1/3 处, 因为, 该处是决定根管治疗的关键部位。一方面, 根尖 1/3 区域为低氧环境, 专性厌氧菌易于繁殖, 根尖周组织与感染根管交界处的组织液及一些炎性渗出物能向以蛋白质为主要生长来源的 BPB 提供营养, 使细菌在根尖 1/3 区域大量存在, 把取样范围控制在根尖 1/3 也将更易于检出这些细菌^[7, 10]。另一方面, 根尖 1/3 处有根尖孔及较多的根管侧支, 因而根尖 1/3 处的细菌可通过这些途径到达根尖周组织引起感染。如果以整个根管里的组织液作样本, 检测到的根管上方的细菌可能与根尖周组织的炎症关系并不密切, 不能真实反映与感染根管相关细菌的情况^[7]。

Siqueira 等^[5]在 2001 年以完整根管作为取样区域时发现, BPB 检测率为 59%, 其中牙龈卟啉单胞菌 28%、牙髓卟啉单胞菌 43%、中间普雷沃菌 6%、变黑普雷沃菌 7%。2004 年, 他们在将取样范围局限在根尖 1/3 区域时发现, BPB 的检测率仅为 22%, 其中牙龈卟啉单胞菌 4%、牙髓卟啉单胞菌 17%、中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌均为 0, 细菌检测率普遍偏低^[7]。他们认为, 造成这种差异的原因之一可能就是取样部位的不同。

4 患者的临床症状

多项研究显示, 如果按患者临床症状的不同将其分组, 各组 BPB 检测率会不同。在有疼痛的患者中, BPB 的检测率为 65.8%, 肿胀患者中为 76.7%, 而有脓性分泌物的患者中为 71.4%^[4]。Gomes 等^[11]认为, 卟啉菌与叩诊敏感, 肿胀、脓性物渗出的症状相关性较高, 而普雷沃菌与疼痛可能有关。

在闫培芳等^[12]对慢性根尖周炎患者进行的研

究中, 中间普雷沃菌与变黑普雷沃菌在有症状组的检测率明显高于无症状组, 中间普雷沃菌在有自发痛组中的出现率是 66.67%, 而在无自发痛组中仅 21.34%。他们认为, 中间普雷沃菌在根尖周病的发生发展中起着重要的作用。普雷沃菌所含有的内毒素可以使机体产生缓激肽, 从而引发疼痛^[11]。

牙龈卟啉单胞菌与牙髓卟啉单胞菌近年来与患牙临床症状的关系也日益受到重视。Siqueira 等^[13]发现, 在急性根尖周脓肿患者的感染根管中, 牙龈卟啉单胞菌的检出率为 40%, 牙髓卟啉单胞菌的检出率为 70%。Baumgartner 等^[8]发现, 牙龈卟啉单胞菌在有脓肿的患牙中检测率可达 72%。Gomes 等^[14]发现, 牙龈卟啉单胞菌在感染根管中的总检测率为 44%, 而在有脓肿的患牙中则达 60%。Siqueira 等^[15]发现, 牙龈卟啉单胞菌在慢性根尖周炎组中的检测率为 36%, 急性根尖脓肿组中则达 67%。唐子圣等^[10]发现, 牙龈卟啉单胞菌与牙髓卟啉单胞菌在慢性根尖周脓肿患牙中, 同时出现率达 66.7%。以上研究说明, 牙龈卟啉单胞菌和牙髓卟啉单胞菌与脓肿的形成相关性较大。卟啉菌可促使中性粒细胞释放溶酶体酶, 破坏细胞的胞外基质, 从而形成脓肿^[14]。

虽然, 目前还没有研究能明确指出某种细菌与临床症状的确切关系, 但多项试验显示, 患者症状的有无很可能是影响细菌检测率的原因。

5 检测方法

5.1 细菌培养法

传统的细菌培养法长久以来被视为检测细菌的金标准^[17]。与分子生物学方法相比较, 细菌培养法所需设备简单, 但费时, 检测率低, 特异性也较差^[3, 6, 11, 18]。例如, 细菌培养法无法在显微镜下鉴别中间普雷沃菌与变黑普雷沃菌, 只有利用分子生物学技术才能检测到中间普雷沃菌与变黑普雷沃菌基因序列间的细微差别^[19]; 而且, 细菌培养法检测到的中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌中有一部分细菌的 16S rRNA 序列与中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌均不同, 从而将其新命名为坦纳普雷沃菌^[20]。

另外, 试验中运输样本的时间、厌氧环境的控制、选择的培养基等都会影响结果, 因此, 细菌培养法获得的数据精确性不高, 更多学者^[1, 3-4]应用分子生物学技术进行了试验。

5.2 分子生物学技术

5.2.1 PCR PCR是一种在体外以人工酶促合成DNA的技术,可在短时间内使特异DNA产物扩增倍数的实际值达 $10^5 \sim 10^7$ ^[21]。与细菌培养法相比较,PCR快速、检测率高,但设备昂贵且假阳性率高。

PCR不能区分细菌的生存状态,有些原本存在的死菌尽管没有致病作用,仍会被作为检测结果的一部分^[3]。在引物的特异性选择不当时,一些与目的细菌种类相近的菌种也会被当作是目的细菌被检出。这些都导致了结果的假阳性。

传统的单一PCR每次只能扩增一种细菌,若要检测感染根管中的多种细菌,尚需进行多次反应。为了提高检测效率和降低扩增时错配的发生,诞生了一些PCR衍生技术,包括多重PCR和巢式PCR。

多重PCR是在同一反应中采取多对引物同时扩增数个不同的DNA片段,降低了扩增次数,但是引物的设计和试验条件的控制非常严格^[22]。由于多重PCR反应提供的酶与核苷酸是有限的,在竞争作用下,一些扩增效率较高的产物将抑制扩增效率低的产物,因而需选择合适的试验条件使目的基因都能达到较高产量,并要求同一反应中的引物对序列相似,但又有各自的特异区^[1]。

巢式PCR则是使用两对引物分别进行扩增,即使第1次扩增产生了错误的片段,第2次在错误片段的基础上进行配对扩增的概率极低,因而特异性更好^[22];但两次扩增,可能使交叉污染的概率增加^[22]。

5.2.2 基因芯片技术 利用PCR技术检测混合感染中的细菌时需设计多个引物,进行多次反应,即便是多重PCR也由于反应条件难以控制,使一次反应所能检测的细菌种类受到限制^[16]。相比之下,基因芯片技术只需一对通用引物,一次PCR反应就可检测大量细菌,具有高通量和高效率的优点^[23]。

通过基因芯片技术对BPB进行检测,杂交结果不但与基因测序的结果一致,而且各细菌之间没有交叉反应^[24-25]。唐子圣等^[16]在对76例慢性根尖周炎患牙行基因芯片检测后发现,牙龈卟啉单胞菌检测率为32.89%,牙髓卟啉单胞菌为48.68%,中间普雷沃菌为42.11%,普遍高于细菌培养法的结果。其中,牙龈卟啉单胞菌与牙髓卟啉单胞菌的检测率与Siqueira等^[9]利用PCR技术获得的结

果相似。目前,基因芯片技术已成为检测BPB的有效手段。

6 总结

BPB在感染根管中检测率较高,并受到样本量,样本来源地区,取样部位,患者的临床症状以及检测方法等多因素的影响。本文仅仅对现有国内外文献中的试验数据进行了比较与分析,若要明确这些因素对检测率的具体影响,还需进行更多的专项试验,从而更准确地获知BPB与根尖周感染的关系。

7 参考文献

- [1] Seol JH, Cho BH, Chung CP, et al. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin[J]. J Endod, 2006, 32(2): 110-114.
- [2] Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions[J]. Int Endod J, 1999, 32(3): 204-210.
- [3] Tomazinho LF, Avila-Campos MJ. Detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in chronic endodontic infection[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 103(2): 285-288.
- [4] Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, et al. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR[J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(4): 211-215.
- [5] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JC, et al. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin[J]. J Endod, 2001, 27(9): 563-566.
- [6] Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, et al. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections[J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(4): 253-258.
- [7] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, et al. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: A molecular investigation[J]. J Endod, 2004, 30(9): 638-643.
- [8] Baumgartner JC, Siqueira JF Jr, Xia T, et al. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction[J]. J Endod, 2004, 30(3): 141-144.
- [9] Umeda M, Chen C, Bakker I, et al. Risk indicators for harboring periodontal pathogens[J]. J Periodontol, 1998, 69(10): 1111-1118.

- sential hypertension[J]. Hypertension, 1998, 32(1):3-8.
- [12] Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2003, 5(1):19-25.
- [13] Li Q, Guo Y, Tan W, et al. Cardioprotection afforded by inducible nitric oxide synthase gene therapy is mediated by cyclooxygenase-2 via a nuclear factor-kappaB dependent pathway[J]. Circulation, 2007, 116(14):1577-1584.
- [14] Tamemoto H, Ishikawa SE, Kawakami M. Association of the Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene with ischemic heart disease in Japanese diabetic subjects[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 80(2):275-279.
- [15] Zhang C, Lopez-Ridaura R, Hunter DJ, et al. Common variants of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary heart disease among U.S. diabetic men[J]. Diabetes, 2006, 55(7):2140-2147.
- [16] Ezzidi I, Miraoui N, Mohamed MB, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 2008, 68(4):542-546.
- [17] Neugebauer S, Baba T, Watanabe T. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2000, 49(3):500-503.
- [18] Noiri E, Satoh H, Taguchi J, et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease[J]. Hypertension, 2002, 40(4):535-540.
- [19] Kendall HK, Haase HR, Li H, et al. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts[J]. J Periodontol Res, 2000, 35(4):194-200.
- [20] Berdeli A, Gürkan A, Emingil G, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in periodontal diseases[J]. J Periodontol, 2006, 77(8):1348-1354.
- [21] Batista AC, Silva TA, Chun JH, et al. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease[J]. Oral Dis, 2002, 8(5):254-260.
- [22] Gyurko R, Shoji H, Battaglini RA, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss[J]. Bone, 2005, 36(3):472-479.

(本文编辑 李彩)

(上接第199页)

- [10] 刘鲁川, 史俊南, 吉昌华. PCR和核酸探针在临床牙周炎检测中应用的对比研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1997, 15(4):297-299.
- [11] Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, et al. Microbiological examination of infected dental root canals[J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(2):71-76.
- [12] 闫培芳, 梁景平, 李超伦, 等. 慢性根尖周炎根管中8种厌氧菌检出分析[J]. 口腔医学, 2006, 26(4):250-252.
- [13] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Oliveira JC, et al. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction[J]. J Endod, 2001, 27(3):164-167.
- [14] Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, et al. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections[J]. J Endod, 2007, 33(9):1049-1052.
- [15] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections[J]. J Endod, 2008, 34(11):1332-1336.
- [16] 唐子圣, 曹慧敏, 刘正, 等. 基因芯片技术分析慢性根尖周炎患牙产黑色素菌[J]. 临床口腔医学杂志, 2009, 25(2):82-85.
- [17] Jung IY, Choi BK, Kum KY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection[J]. J Endod, 2000, 26(10):599-604.
- [18] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, et al. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing[J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22(4):266-271.
- [19] Yoshida A, Tachibana M, Ansai T, et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black-pigmented *Prevotella species* in oral specimens[J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(1):43-46.
- [20] Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneræ* from endodontic infections[J]. Oral Microbiol Immunol, 2000, 15(4):273-275.
- [21] 施文元, 周学东. 人体口腔微生物群的相互作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(1):1-4.
- [22] 药力波, 常智杰. 医学分子生物学实验技术[M]. 人民卫生出版社, 2002:119-123.
- [23] 唐子圣, 刘正. 生物芯片技术及其在细菌学研究中的应用[J]. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(4):249-251.
- [24] 唐子圣, 曹慧敏, 刘正, 等. 应用16S rDNA结合膜芯片检测3种产黑色素牙周可疑致病菌[J]. 上海口腔医学, 2006, 15(3):290-293.
- [25] 江禾, 曹慧敏, 唐子圣, 等. 应用16S rDNA基因芯片检测4种产黑色素感染根管可疑致病菌[J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23(11):655-658.

(本文编辑 汤亚玲)