# بررسی میکروارگانیسم پاتوژن آبسه های پری اپیکال در دندانهای شیری□

دکتر قاسم انصاری*، دکتر میترا طبری**، دکتر بهرام کاظمی***

## *Assessment of pathogens microorganisms of periapical abscess in primary teeth*

[1]Ansari G. ***DDS. MS. PhD.*** [2]Tabari M. ***DDS. MS.*** [3]Kazemi B. ***BSc. PhD (Microbiol, Immunol)***

[1]Assoc. Prof. Dept. of Pediatric Dentistry, Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran-Iran, [2]Assistant Prof., Dept. of Pediatric Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol-Iran. [3]Assoc. Prof., Dept. of Immunology and Microbiology, Medical School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran-Iran.

***Key Words*:** Dental abscess, PCR, Porphyromonas gingivalis, Prevotella, Melaninogenica

***Purpose:*** Dental abscess is considered as one of the most common complications of untreated caries in children. Microorganisms are known as major causes for the pulp and periradicular pathosis. Black – pigmented, gram – negative anaerobes, belonging to species of porphyromonas and prevotella (bacteroides) play an important role in causing clinical signs and symptoms related to pulp and periradicular disease. The aim of this investigation was to assess the presence of two main pathogenic microorganisms named porphyromonas gingivalis and prevotella melaninogenica in abscessed primary teeth.

***Methods & Materials:*** Forty children aged 4-10 years were selected with no systemic disease and no antibiotic consumption during the last two weeks of sampling. Selected teeth were presenting swelling and pain at observation stage as signs of acute abscess. The diagnostic technique of porphyromonas gingivalis and prevotella melaningenica was the use of DNA formulation reading by means of PCR technique.

***Results:*** Results showed that of the 40 samples, 35(%87.5) were positive for porphyromonas gingivalis, 34(%85) were positive for prevotella melaninogenica. However, it seems that more work is required for more precise antibiotic therapy of dental abscess in children.

***Conclusion:*** The presence of two well known species of microorganisms in periapical abscess of primary teeth was confirmed. ***Beheshti Univ. Dent. J. 2005; 22(4):567-573***

## خلاصه

***سابقه و هدف:*** **آبسه های دندانی یکی از مشکلات شایع در کودکان هستند. میکروارگانیسم ها بعنوان علت اصلی بیماری پالپ و پری رادیکولار شناخته شده اند که در بین آنها ارگانیسم های بی هوازی گرم منفی تولید کننده پیگمان سیاه متعالق به گونه های پورفیرومونا‌س و پری وتلا (باکتروئیدها) نقش مهمی را در ایجاد علائم و نشانه های کلینیکی بیماری پالپ و پری رادیکولار بازی می کنند. لذا این مطالعه با هدف بررسی حضور دو میکروارگانیسم پاتوژن prevotella melaninogenica و porphyromonas gingivalis در آبسه های ادنتوژنیک دندان های شیری در ۴۰ کودک ۱۰-۴ ساله مراجعه کننده به بخش اطفال دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال تحصیلی ۷۹-۱۳۷۸ انجام گرفت.**

***مواد و روشها:*** **روش تحقیق حاضر از نوع بررسی آزمایشگاهی و روش نمونه گیری ساده بود. بیماران انتخاب شده هیچگونه بیماری سیستمیک نداشته و حداقل دو هفته قبل از نمونه گیری، آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند. کلیه بیماران انتخاب شده حداقل یک دندان مبتلا به آبسه قابل مشاهده کلینیکی همراه با سابقه درد طی روزهای اخیر داشتند. از تکنیک Polymerase Chain Reaction (PCR)**

□طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم دندانپزشکی

*دانشیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

**استادیار گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

***دانشیار گروه ایمونولوژی و میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

**برای شناسایی میکروارگانیسم ها استفاده شد.**

***یافته ها:*** **طبق اطلاعات بدست آمده حضور porphyromonas gingivalis در ۸۷/۵٪ موارد و prevotella melaninogenica در ۸۵٪ موارد تأیید شد. با توجه به حضور گسترده این میکروارگانیسم ها در آبسه ها و نیز با عنایت به اینکه بیشترین طیف مقاومت میکروبی در مقابل آنتی بیوتیک ها در باکتروئیدها مشاهده شده است. هر چند درمان های آنتی بیوتیکی مناسب جهت کنترل عفونت دندانهای شیری مستلزم بررسی های دقیق تری از نظر کاربرد و تجویز می باشد.**

***نتیجه گیری:*** **با مشاهدهٔ درصد نسبتاً بالای (۸۵٪) میکروارگانیسم های ذکر شده می توان حضور این دو میکروارگانیسم کاملاً شناخته شده را در ایجاد عارضه تأیید نمود.**

**تاریخ پذیرش مقاله:۸۱/۱۰/۲۸ تاریخ تأیید مقاله:۸۲/۲/۱۱**

**واژه های کلیدی: آبسه های دندانی، PCR، Porphyromonas، Prevotella melaninogenica، Gingivalis**

**مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، سال۱۳۸۳؛ جلد(٤)۲۲: صفحه ٥٦٧ الی ٥٧٣**

#

## مقدمه

شیوع پوسیدگی در کودکان خصوصاً در دندان های شیری بالاست. اکسپوژر پالپ به دنبال پوسیدگی ممکن است به عفونت و ایجاد ضایعات پری اپیکال منجر شود[۱]. طبق آمار موجود در سال ۱۹۹۴، ۴۰٪ ویزیت های اورژانس دندانپزشکی به خاطر عفونت بوده که ۵۳/۵٪ موارد به علت آبسه های پری اپیکال و لثه ای گزارش شده اند[۲]. میکروارگانیسم ها بعنوان علت اصلی بیماری پالپ و پری رادیکولار شناخته شده اند[۳]. بسته به روش کشت و روش های تعیین باکتریها، انواع و تعداد ارگانیسم های ایزوله شده به میزان قابل ملاحظه ای متفاوت می باشند[۴]. نتایج گزارش شده نشان می دهند که شدت التهاب پالپال و پری رادیکولار با مقدار میکروارگانیسم ها در کانال های ریشه و اینکه چه مدت این بافتها در مقابل میکروارگانیسم ها اکسپوز بوده اند، ارتباط مستقیم دارد. بطوریکه نشان داده شده است که مقدار التهاب در عفونت مختلط (mixed) از شدت بیشتری برخوردار است[۵]. Sundqvist (۱۹۷۹) ارتباط مشخصی را بین حضور prevotella melaninogenica و علائم و نشانه های کلینیکی و رادیوگرافیک بیماری پری رادیکولار نشان داد[۶]. Griffee و همکاران (۱۹۸۰) ارتباط مشابهی را میان حضور این میکروارگانیسم و درد، تشکیل sinus tract و بوی بد دهان گزارش نمودند[۷]. Haapsalo (۱۹۸۹) براساس باکتریولوژی ۶۲ کانال ریشه عفونی انسان گزارش داد که سمپتوم های حاد معمولاً در ارتباط با حضور بی هوازی های خاص مانند porphyromonas endodontalis، prevotella porphyromonas gingivalis می باشند[۸]. Gomes و همکاران (۱۹۹۶) ارتباط مشهودی میان یافته های کلینیکی از جمله درد و تورم با گونه های peptostreptococcus prevotella melaninogenica گزارش نمود[۹]. هدف از این بررسی تعیین میزان حضور PG و PM به عنوان دو میکروارگانیسم پاتوژن آبسه های

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

دندان های شیری در نمونه های مورد مطالعه بود.

## مواد و روشها

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی و مشاهده ای و روش نمونه گیری ساده بوده است. نمونه های مورد بررسی در این مطالعه از بین دندانهای مبتلا به آبسه پری رادیکولار در گروه دندان های شیری کودکان ۱۰-۴ ساله که در سال تحصیلی ۷۹-۱۳۷۸ به بخش اطفال دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، تهیه گردیدند. در مجموع تعداد ۴۰ بیمار در این مطالعه شرکت داده شدند. بیماران انتخاب شده، تاریخچه بیماری سیستمیک نداشته و هیچکدام از آنها در هنگام نمونه گیری طی دو هفته قبل از نمونه گیری آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند. تورم به صورت کلینیکی در بافت نرم دندان مبتلا مشاهده می شد و سابقهٔ درد طی روزهای اخیر ذکر می گردید. پس از تکمیل پرسشنامه، سطح مخاط دهان در ناحیه مبتلا ابتدا ایزوله و بعد بوسیله پویدون آیداین ضدعفونی می شد، سپس بوسیله پنبه استریل خشک می گردید. نمونه گیری از آبسه پری رادیکولار دندان های شیری با سوراخ کردن قله آبسه بوسیله سوند استریل و جمع آوری ترشحات به کمک لولهٔ موئینه توسط رزیدنت دندانپزشکی کودکان انجام می گرفت. سپس محتوای جمع آوری شده در لوله های ۱/۵ میلی لیتری بوسیله شستشو با سرم فیزیولوژی تخلیه و برای انجام تست Polymerase Chain Reaction (PCR) در فریزر نگهداری می شد. در هنگام آزمایش پس از تخلیص DNA، لوله های PCR جهت انجام واکنش PCR آماده می گردیدند. به این منظور از مواد زیر استفاده می شد:

۱- DNA هدف (Template DNA)

۲- بافرPCR×۱۰(شامل۵۰۰mM kcl،۲۰۰mM Tris–Hcl) به میزان ۵ میکرولیتر

۳- مخلوط ۴ دزاکسی ریبونوکلئوتید سه فسفاته (dNTPs) به میزان ۰/۵ میکرولیتر

۴- کلرورمنیزیوم به میزان ۱/۵ میکرولیتر (فلز mg کوفاکتور آنزیم Taq پلیمراز است).

۵- آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۵ میکرولیتر

۶- آغازگر (پرایمر اختصاصی) به میزان ۰/۵ میکرولیتر

توالی اولیگونوکلئوتیدهای بکار رفته در آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی PG[۱۰]:

5' CGT GCC AGC CGC GGT AAT ACG 3'

5' TAC ATA GAA GCC CCG AAG GAA GAC G 3'

توالی اولیگونوکلئوتیدهای بکار رفته در آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی PM[۱۱]:

5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'

۷- آب مقطر دیونیزه: که مقدار آن براساس غلظت DNA تنظیم شد بطوریکه حجم نهائی واکنش ۵۰ میکرولیتر باشد.

مواد فوق در لولهٔ انجام واکنش ریخته شده، پس از قرار دادن لوله های آماده شده در دستگاه ترموسیکلر،

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

برنامه های زیر به دستگاه داده شد.

الف) برنامه انجام PCR برای PC:

Extension (۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه)، Annealing (۵۷ °C به مدت ۲۰ ثانیه) و Denaturation (۹۴ °C به مدت ۲۰ ثانیه) که در ۳۰ چرخه تکرار شد.

ب) برنامه انجام PCR برای PM:

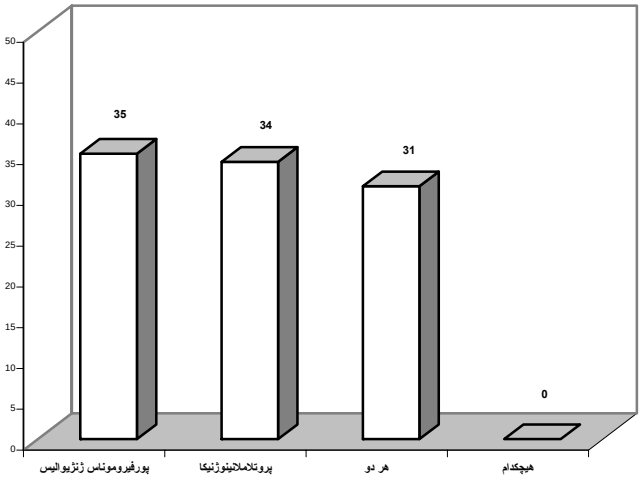
Extension (۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه)، Annealing (۶۰ °C به مدت ۲۰ ثانیه) و Denaturation (۹۴ °C به مدت ۲۰ ثانیه) که در ۳۴ چرخه تکرار شد.

البته در شروع هر برنامه یک دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و در پایان هر برنامه یک extension نهائی با دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه وجود داشت.

به منظور کنترل انجام واکنش PCR از نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی در هر سری واکنش استفاده شد. نمونه های کنترل مثبت، نمونه هایی بودند که قبلاً حضور میکروارگانیسم در آنها محرز شده بود و نمونه های کنترل منفی آنهائی بودند که به جای DNA هدف در آنها از آب استفاده شده بود. لازم به ذکر است که زمان هر کدام از مراحل و همچنین درجه حرارت annealing برای هر یک از آغازگرهای اختصاصی بصورت تجربی بدست آمد. البته حدود آنها قبلاً بوسیله نرم افزارهای طراحی پرایمر مانند DNASIS و OLigo مشخص شده بود. پس از انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید، الکتروفورز شده، سپس در دستگاه Image Analyzer قرار داده شد تا بندهای تشکیل شده DNA به کمک نور UV با طول موج ۲۵۴ یا ۳۱۲ نانومتر قابل رویت شوند. در پایان بندهای تشکیل شده با ۱۰۰bp DNA Marker ساخت شرکت Roche Molecular Biochemical مقایسه شدند.

## یافته ها

در بررسی های انجام شده با روش PCR بر روی ۴۰ نمونه آبسه مربوط به دندان های شیری کودکان ۱۰-۴ ساله (با میانگین سنی ۷/۱ سال) که فاقد بیماری سیستمیک بودند و حداقل دو هفته قبل از نمونه گیری آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند و دست کم دارای یک دندان سمپتوماتیک (درد و تورم) بودند، حضور porphyromonas gingivalis در ۸۷/۵٪ و prevotella melaninogenica در ۸۵٪ موارد تأیید شد. (نمودار ۱)

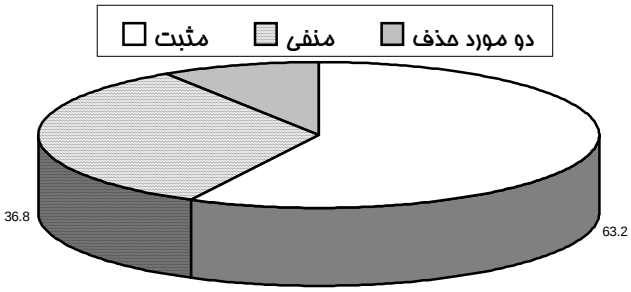



نمودار ۱- توزیع فراوانی میکروارگانیسم های مورد بررسی در آبسه های پری اپیکال دندان های شیری در کودکان مراجعه کننده به بخش اطفال دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال تحصیلی ۷۹-۱۳۷۸

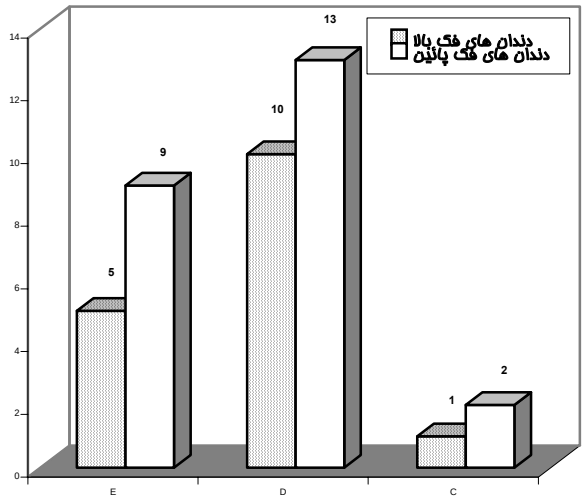
البته با توجه به اینکه شرایط بررسی ژن بتالاکتاماز نیز وجود داشت، در ۳۸ مورد از ۴۰ نمونه با تکنیک PCR

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

حضور ژن بتالاکتاماز بررسی شد زیرا در دو نمونه DNA هدف جهت انجام آزمایش وجود نداشت (نمودار ۲). لازم به ذکر است در یک مورد هیچکدام از دو میکروارگانیسم وجود نداشتند در حالیکه حضور ژن بتالاکتاماز مثبت بود.




نمودار ۲- توزیع فراوانی ژن بتالاکتاماز در آبسه های پری اپیکال دندان های شیری در کودکان مراجعه کننده به بخش اطفال دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال تحصیلی ۷۹-۱۳۷۸




نمودار ۳- توزیع فراوانی نوع دندان در آبسه های پری اپیکال دندان های شیری در کودکان مراجعه کننده در بخش اطفال دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال تحصیلی ۷۹-۱۳۷۸

در مورد نوع دندان، ابتلاء دندان های D بیشتر از سایر دندان ها بود (نمودار ۳). جزئیات بیشتر در نمودارها نمایش داده شده است. گفتنی است که ۳۴ مورد از ۴۰ نمونه مورد بررسی (۶۰٪) مربوط به دخترها و ۱۶ مورد (۴۰٪) مربوط به پسرها بوده است.

## بحث

از آنجا که به دنبال بررسی میزان حضور دو میکروارگانیسم پاتوژن PG و PM در آبسه های پری رادیکولار دندانهای شیری، مقادیر قابل ملاحظه و بالای ۸۷/۵٪ و ۸۵٪ بدست آمده، طبیعی است که بتوان این دو میکروارگانیسم را که بعنوان عوامل ایجاد آبسه های دندانی شناخته شده اند را در این نمونه ها نیز تأیید نموده و در مورد دندانهای شیری هم تعمیم داد. موارد مشابه این مطالعه نیز از درصدهائی نزدیک در این رابطه حکایت دارند.

Bass و Bogen (۱۹۹۸) ضایعات پری اپیکال ۱۳ دندان، که نسبت به درمان ریشه مقاوم بودند را کشت داده، PG را در ۴/۶٪ موارد مشاهده کردند[۱۲]. Weigner و همکاران (۱۹۹۵)، فلور میکروبی sinus tract، ۱۲ دندان را کشت دادند و PG را در ۷۵٪ موارد ایزوله نمودند[۱۳]. علت کم بودن فراوانی PG در مطالعه اول، ناشی از نمونه برداری از آبسه های بسته بود. آبسه های پری اپیکال بسته به ضایعاتی اطلاق می شود که در اثر نکروز پالپ متعاقب تروما و کلسیفیکاسیون ایجاد شده باشند. در حالیکه ضایعات پری اپیکال باز به ضایعاتی اطلاق می شود که به دنبال پوسیدگی دندانی، میکرولیکیج اطراف ترمیم، درمان ریشه ناقص، نقائص پریودنتال، sinus tract و یا

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019

ارتباط با سینوس ماگزیلا ایجاد شده باشند[۱۲]. در مطالعه دوم و مطالعه حاضر، نمونه برداری از ضایعات پری اپیکال باز انجام شده است. لذا PG که در نواحی مختلف دهان حضور دارد با آبسه ها فراوانی بالائی مشاهده شده است.

Brook و همکاران (۱۹۹۱) پس از بررسی آبسه های پری اپیکال ۳۹ بیمار به کمک تکنیک کشت میکروبی، حضور PM را در ۲۹/۵٪ موارد گزارش نمودند[۱۳]. Sakamoto و همکاران (۱۹۹۷) با روشی مشابه در ۷۳/۹٪ موارد گونه های پروتلا را مشاهده کردند[۱۴] که در مطالعه فعلی فقط حضور prevotella melaninogenica در ۸۵٪ موارد تأیید شد.

علت بالا بودن فراوانی میکروارگانیسم های مورد بررسی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات قبلی، برتری و دقت تکنیک PCR نسبت به روش کشت و از بین رفتن تعدادی از نمونه ها در طی انتقال به لابراتوار در تکنیک کشت بوده است.

#

## نتیجه گیری

بررسی حضور میکروارگانیسم در مراکز عفونی محیط دهان از جمله آبسه های دندانی، به دندانپزشک این فرصت را خواهد داد تا در صورت لزوم با دقت بیشتری نسبت به انتخاب و تجویز داروی مناسب اقدام نماید.

حضور گستردهٔ پورفیروموناس ژنژیوالیس (۸۷/۵٪) و پری وتلا ملانینوژنیکا (۸۵٪) در عفونت های ادونتوژنیک کودکان دیده شد. مشاهده مقاومت در میکروارگانیسم های موجود در این عفونت ها نیاز به مطالعات وسیعتر در جهت یافتن درمان دارویی مناسب را مشخص خواهد نمود.

## *References:*


1. Sanders B: Oral and maxillofacial surgery. In: Stewart RE, Barber TK, Troutman KC, Wei SHY: Pediatric Dentistry: Scientific foundations and clinical practice. **1st Ed**. *St Louis: The CV Mosby Co* 1982;Chap65:976-978
2. Zeng Y, Sheller B, Milgrom P: Epidemiology of dental emergency visits to an urban children's hospital. *Pediatr Dent* 1994;**16**:419-423
3. Kattering JD, Torabinejad M: Microbiology and immunology. In: Cohen S, Burns RC: Pathways of the pulp. **7th Ed.** *St. Louis: The CV Mosby Co.* 1998;Chap13:463-464
4. Kantz WE, Henry CA: Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chamber of nonvital teeth in man. *Arch Oral Biol* 1974;**19**:91-96
5. Korzen B, Krakow A, Green D: Pulpal and periapical tissue responses in conventional and monoinfected gnotobiotic rats. *Oral Surg* 1974;**37**:783-7
6. Sundqvist G, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT: Capacity of anaerobic bacteria from necrotic from dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immunol* 1970;**25**:685-93
7. Griffe MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawty Alt, Newton CW: The relationship of bacteroides melaninogenicus to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;**50**:457-61
8. Haapsalo M: Bacteroides spp in dental root canal infections. *Endodontic Dent Traumatol* 1989;**5**:1-10

9. Gomes BP, Lilley JD, Brucker DB: Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996;**29**:69-75
10. Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M: Rapid detection of Actinobacillus actinomycetem comitans, prevotella intermedia and porphyromonas gingivalis by multiplex PCR. *J Periodont Res* 1998;**33**:59-64
11. Haraldsson G, Holbrook WP: A hemagglutinating variant of prevotella melaninogenica isolated from the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol* 1998;**13**:362-367
12. Abou – Rass M, Bogen G: Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998;**31**:39-47
13. Brook I, Frazier EH, Cher ME: Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1991;**6**:123-125
14. Sakamoto H, Kato H, Sato T, Sasaki J: Semiquatitative bacteriology of closed odontogenic abscesses. *Bull Tokyo Dent Coll* 1998;**39**:103-7

Downloaded from jds.sbmu.ac.ir at 0:06 +0430 on Monday April 22nd 2019