

ELŻBIETA ZEDLER¹, ANNA KĘDZIA², ADAM ZEDLER³,
AGNIESZKA BOGUSŁAWSKA-KAPAŁA¹, BARBARA KOCHAŃSKA¹

CZĘSTOŚĆ IZOLOWANIA BAKTERII MIKROAEROFILNYCH Z ZIARNINIĄKÓW OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH ZĘBÓW

FREQUENCY OF ISOLATION OF MICROAEROPHILIC BACTERIA FROM DENTAL PERIAPICAL GRANULOMAS

¹ Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej AM w Gdańsku
kierownik: dr hab. B. Kochańska

² Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej AM w Gdańsku
kierownik: dr hab. Anna Kędzia, prof. AMG

³ Samodzielna Pracownia Chirurgii Stomatologicznej AM w Gdańsku
kierownik: dr n. med. M. Dijkiewicz

Celem pracy było zbadanie częstości występowania bakterii mikroaerofilnych w ziarniniakach okołowierzchołkowych zębów oraz oznaczenie najczęściej izolowanych gatunków i rodzajów tych drobnoustrojów.

Bakterie mikroaerofilne stwierdzono w 48 (68,6%) ziarniniakach okołowierzchołkowych. Łącznie wyizolowano 66 szczepów omawianych drobnoustrojów. Do najczęściej wyodrębnianych bakterii mikroaerofilnych z okołowierzchołkowych zmian ziarninowych należały Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oraz z rodzaju *Capnocytophaga*.

Dotychczasowe wyniki badań potwierdzają dużą rolę drobnoustrojów w powstawaniu przelekłych zmian okołowierzchołkowych zębów [3, 7, 8], przy czym nie wskazują one jednoznacznie, czy te patologiczne zmiany mają charakter jałowy, czy występują w nich drobnoustroje. Jak wynika z piśmiennictwa, istnieją doniesienia wskazujące na obecność bakterii w ziarniniakach [4, 11, 13, 14], jak również takie badania, które potwierdzają teorię o ich jałowości [6, 7, 8, 9].

W przypadkach zmian okołowierzchołkowych, w których stwierdzano obecność bakterii, przeważały infekcje mieszane [13, 14], w których uczestniczyły drobnoustroje rosnące zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych. Są również doniesienia wskazujące, że z zakażonych zmian okołowierzchołkowych izolowano bakterie mikroaerofilne, w tym z gatunku *Wolinella recta* [14], *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, z rodzaju *Campylobacter* oraz rodzaju *Capnocytophaga* [11]. Bakterie mikroaerofilne, zwłaszcza te

z rodzaju *Capnocytophaga* i gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans* wytwarzają enzymy, które mogą osłabić spójność tkanek przyzębia [5]. Gatunek *Actinobacillus actinomycetemcomitans* jest ściśle związany z młodzieńczym zapaleniem przyzębia i szybko postępującym zapaleniem przyzębia u dorosłych. Wytwarza on szereg czynników patogennych, m.in. kolagenazę, endotoksynę, leukotoksynę i otoczkę wielocukrową [10, 12, 15]. Bakterie te kojarzone są głównie z chorobami przyzębia brzeżnego [5, 10, 12, 15] i interesujące byłoby stwierdzenie, jaka jest ich rola w chorobach tkanek przyzębia okołowierzchołkowego. Rozbieżności w wynikach doświadczeń uzyskanych przez różnych autorów, jak również mała liczba informacji na temat udziału bakterii mikroaerofilnych w zakażeniach zmian okołowierzchołkowych zębów zachęcają do podjęcia badań w tym kierunku.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena częstości występowania bakterii mikroaerofilnych w ziarniniakach okołowierzchołkowych zębów w przypadkach, w których nie stwierdzono objawów patologii przyzębia brzeżnego oraz oznaczenie najczęściej izolowanych gatunków i rodzajów drobnoustrojów.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 70 zębów (37 zębów górnych i 33 zęby dolne, w tym 54 zęby trzonowe, 9 przedtrzonowych, 6 siekaczy i 1 kieł) z przewlekłym ziarninowym zapaleniem tkanek okołowierzchołkowych, które zostały usunięte razem z ziarniniakiem okołowierzchołkowym. Jak wynikało z badania poprzedzającego ekstrakcję, zęby te nie były leczone endodontycznie i istniały bezwzględne wskazania do ekstrakcji, jednocześnie nie występowało zapalenie przyzębia brzeżnego. Aby zminimalizować możliwość zakażenia naturalną mikroflorą jamy ustnej, ziarniniaki, które stanowiły materiał do badań mikrobiologicznych, bezpośrednio po ekstrakcji zęba obcinano sterylnymi nożyczkami do jałowych pojemników zawierających płyn transportowy przygotowany metodą PRAS i w czasie godziny dostarczano do laboratorium. Z każdego z 70 pobranych materiałów wykonano preparat bezpośredni, który barwiono metodą Grama. W celu wyhodowania bakterii mikroaerofilnych materiały te posiewano na powierzchni agaru Columbia i Brucella z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz agaru tryptynowo-sojowego z zawartością bacytracyny i wankomycyny (TBSV), selektywnego podłoża dla *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [10]. Inkubację prowadzono w anaerostatach zawierających Campy Pak (BBL) przez 4–5 dni w temp. 37 °C. Wyzolowane szczepy bakterii mikroaerofilnych identyfikowano przy użyciu dostępnych testów biochemicznych (API, API-ZYM System Bio Merieux) zgodnie z obowiązującymi zasadami [1].

WYNIKI BADAŃ

Obecność drobnoustrojów mikroaerofilnych stwierdzono w 48 spośród 70 badanych ziarniniaków okołowierzchołkowych zębów (tab. I). Z 19 ziarniniaków wyodrębniono Gram-ujemne

Tab. I

Występowanie poszczególnych gatunków i rodzajów bakterii mikroaerofilnych w 48 ziarniniakach okołowierzchołkowych zębów

The presence of respective species and genera of microaerophilic bacteria in 48 dental periapical granulomas

Liczba materiałów w których stwierdzono występowanie danych bakterii mikroaerofilnych The number of material with the presence of respective microaerophilic bacteria		Bakterie mikroaerofilne wyizolowane z ziarniniaków okołowierzchołkowych (liczba szczepów stwierdzonych w jednym materiale) Microaerophilic bacteria isolated from periapical granulomas (the number of strains detected in one sample)				
		Gram-negative rods				Gram-positive rods
		<i>Actinobacillus actinomy-cetemcomitans</i>	<i>Capnocytophaga spp.</i>	<i>Campylobacter spp.</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
32	8	1				
	9		1			
	6			1		
	6				1	
	3				1	
14	4	1		1		
	3	1	1			
	2	1			1	
	1		1		1	
	1			1	1	
	1		1	1		
	2		1		1	
2	1	1		1	1	
	1	1	1			
Liczba i odsetki wyizolowanych szczepów z 48 ziarniniaków The number and percentage of isolated strains from 48 periapical granulomas		19 (28,8%)	17 (25,8%)	12 (18,1%)	12 (18,1%)	6 (9,1%)
		60 (90,9%)				6 (9,1%)
Ogólna liczba wyizolowanych szczepów bakterii mikroaerofilnych Total number of isolated strains of microaerophilic bacteria		66				

pałeczki z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, w 17 ziarniniakach stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Capnocytophaga*, a w 12 ziarniniakach bakterie z rodzaju *Campylobacter*. Z 12 materiałów wyizolowano drobnoustroje z gatunku *Eikenella corrodens*. Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Rothia dentocariosa* stwierdzono w 6 badanych ziarniniakach.

W 32 spośród 48 ziarniniaków stwierdzono obecność tylko jednego szczepu bakterii mikroaerofilnych: w 8 przypadkach były to bakterie z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, w 9 przypadkach drobnoustroje z rodzaju *Capnocytophaga*, w 6 przypadkach z rodzaju *Campylobacter* i w 6 przypadkach z gatunku *Eikenella corrodens*. W 3 przypadkach stwierdzano Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Rothia dentocariosa*. Natomiast w 14 materiałach stwierdzono obecność 2 szczepów bakterii mikroaerofilnych. Drobnoustroje z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans* występowały razem z bakteriami z rodzaju *Campylobacter* w 4 przypadkach, z bakteriami z rodzaju *Capnocytophaga* w 3 przypadkach oraz z gatunkiem *Eikenella corrodens* w 2 przypadkach. Drobnoustroje z rodzaju *Capnocytophaga* występowały z bakteriami z rodzaju *Campylobacter* w 1 ziarniniaku oraz z drobnoustrojami z gatunku *Eikenella corrodens* również w 2 materiałach. W 2 przypadkach Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Rothia dentocariosa* występowały łącznie z drobnoustrojami Gram-ujemnymi: w jednym ziarniniaku z bakteriami z gatunku *Eikenella corrodens*, w jednym z drobnoustrojami z rodzaju *Capnocytophaga*. Natomiast w jednym przypadku z bakteriami z gatunku *Actinoba-*

Tab. II

Gatunki drobnoustrojów mikroaerofilnych z rodzaju *Capnocytophaga* i *Campylobacter* wyizolowane z ziarniniaków okołowierzchołkowych zębów

The species of microaerophilic microorganisms of *Capnocytophaga* and *Campylobacter* genera, isolated from dental periapical granulomas

Bakterie mikroaerofilne Microaerophilic bacteria	Liczba (odsetki) wyizolowanych szczepów The number (percentage) of isolated strains
<i>Capnocytophaga spp</i> w tym: <i>Capnocytophaga ochracea</i> <i>Capnocytophaga gingivalis</i> <i>Capnocytophaga inne gatunki</i>	17 (25,8%) 6 (9,1%) 4 (6,1%) 7 (10,6%)
<i>Campylobacter spp</i> w tym: <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Campylobacter concisus</i> <i>Campylobacter inne gatunki</i>	12 (18,2%) 5 (7,6%) 4 (6,1%) 3 (4,5%)
Ogólna liczba wyizolowanych szczepów bakterii mikroaerofilnych Total number of isolated strains of microaerophilic bacteria	66 (100%)

cillus actinomycetemcomitans i bakteriami z rodzaju *Capnocytophaga*. W jednym materiale stwierdzono jednocześnie obecność bakterii z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, bakterii z rodzaju *Campylobacter* i drobnoustrojów z gatunku *Eikenella corrodens*.

Ogółem wyizolowano 66 szczepów bakterii mikroaerofilnych, w tym 90,9% stanowiły Gram-ujemne pałeczki. Wśród bakterii z rodzaju *Capnocytophaga* (25,8%) stwierdzono następujące gatunki drobnoustrojów: *C. ochracea* (6 szczepów), *C. gingivalis* (4 szczepy) i 7 szczepów innych gatunków (tab. II). Natomiast rodzaj *Campylobacter*, który stanowił 18,2% ogółu wyizolowanych szczepów bakterii, był reprezentowany głównie przez gatunki: *C. gracilis* (5 szczepów) oraz *C. concisus* (4 szczepy) (tab. II).

DYSKUSJA

Występowanie drobnoustrojów w zmianach okołowierzchołkowych zębów badali różni autorzy [2, 4, 11, 13, 14]. Waymann i wsp. [13] przeprowadzając badania histologiczne i bakteriologiczne wykazali obecność bakterii w 51 spośród 58 przypadków ocenianych zmian okołowierzchołkowych zębów (ziarniniaki, torbiele oraz ropnie okołowierzchołkowe). Natomiast Sunde i wsp. [11] badając 36 zębów z opornymi na leczenie zmianami okołowierzchołkowymi tylko w 1 przypadku nie stwierdzili występowania bakterii. Odmienne wyniki przedstawił Nair [7], którego zdaniem bakterie występują głównie w kanale korzeniowym i są oddzielone od pozostałej tkanki zapalnej przez licznie nagromadzone leukocyty wielojądrzaste. Piątkowska [8], wykonując badania histologiczne i mikrobiologiczne 48 ziarniniaków okołowierzchołkowych zębów w żadnym z nich nie stwierdziła obecności drobnoustrojów. Wyniki badań wspomnianych autorów [7, 8] wydają się potwierdzać teorię o jałowości tego typu zmian.

Jak wynika z piśmiennictwa, jeżeli stwierdzano obecność bakterii w zmianach okołowierzchołkowych, najczęściej były to bakterie beztlenowe [13]. Natomiast niewiele jest informacji na temat udziału w tych zakażeniach bakterii mikroaerofilnych. Jak wynika z doniesień, drobnoustroje mikroaerofilne były głównie izolowane ze zmian okołowierzchołkowych opornych na leczenie endodontyczne. Vigil i wsp. [14] izolowali z takich zmian bakterie z gatunku *Wolinella recta*, a Sunde i wsp. [11] stwierdzili obecność drobnoustrojów z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, z gatunku *Eikenella corrodens*, z rodzaju *Capnocytophaga* (gatunki: *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*) oraz z rodzaju *Campylobacter* (gatunki: *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*). Wspomniani autorzy [11, 14] podawali przy tym, że przyzębie brzeżne zębów, których zmiany okołowierzchołkowe stanowiły materiał mikrobiologiczny, było zdrowe i nie stwierdzano zmian typu endo-perio.

W naszych badaniach (dotyczyły one zębów bez zmian w przyzębiu brzeżnym) izolowaliśmy z ziarniniaków również drobnoustroje z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, z gatunku *Eikenella corrodens*, rodzaju *Capnocytophaga* oraz *Campylobacter*. Jednocześnie w żadnym z przypadków nie wyizolowaliśmy bakterii z gatunku *Wolinella recta*, natomiast stwierdziliśmy występowanie innych gatunków bądź rodzajów bakterii mikroaerofilnych (tab. I, II).

WNIOSKI

1. Bakterie mikroaerofilne stwierdzono w 48 (68,6 %) ziarniniakach okołowierzchołkowych zębów.
2. Najczęściej izolowano Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Actinobacillus actinomycetemcomitans* oraz z rodzaju *Capnocytophaga*.

PIŚMIENNICTWO

1. Berg J.D., Nord C.E.: A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand. J. Dent. Res.* 1973, 81, 2, 163. – 2. Bogen G., Slots J.: Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int. Endod. J.* 1999, 32, 3, 204. – 3. Fabricius L., Dahlen G., Holm S.E., Moller A.J.: Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand. J. Dent. Res.* 1982, 90, 3, 200. – 4. Gatti J.J., Dobeck J.M., Smith C., White R.R., Socransky S. S., Skobe Z.: Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod. Dent. Traumatol.* 2000, 16, 5, 197. – 5. Moore W.E., Holdeman L.V., Cato E.P., Smibert R.M., Burmeister J.A., Ranney R.R.: Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect. Immun.* 1983, 42, 2, 510. – 6. Molven O., Olson I., Kerekes K.: Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod. Dent. Traumatol.* 1991, 7, 5, 226. – 7. Ramachandran Nair P.N.: Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J. Endod.* 1987, 13, 1, 29. – 8. Piątowska D.: Histopatologiczne i histobakteriologiczne badania przewlekłych zmian okołowierzchołkowych zębów stałych. *Patol. Pol.* 1989, 40, 1, 69. – 9. Siqueira J.F.Jr., Lopes H.P.: Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int. Endod. J.* 2001, 34, 3, 216. – 10. Slots J., Genco R.J.: Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 1984, 63, 3, 412.
11. Sunde P.T., Tronstad L., Eribe E.R., Lind P.O., Olsen I.: Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod. Dent. Traumatol.* 2000, 16, 5, 191. – 12. Tonjum T, Haas R.: Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by leukotoxin gene-specific hybridization and polymerase chain reaction assays. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 7, 1856. – 13. Wayman B.E., Murata S.M., Almeida R.J., Fowler C.B.: A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J. Endod.*, 1992, 18, 4, 152. – 14. Vigil G.V., Wayman B.E., Dazey S.E., Fowler C.B., Bradley D.V.: Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolate from periapical lesions. *J. Endod.* 1997, 23, 2, 110. – 15. Zambon J.J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1985, 12, 1, 1.

E. Zedler, A. Kędzia, A. Zedler, A. Bogusławska-Kapała, B. Kočańska

FREQUENCY OF ISOLATION OF MICROAEROPHILIC BACTERIA
FROM DENTAL PERIAPICAL GRANULOMAS

Summary

The aim of this study was to determine the frequency of microaerophilic bacteria occurrence in dental periapical granulomas and determination of the most frequently isolated genera and species of microorganisms.

70 teeth, extracted together with periapical granulomas, were the subject of examination. After sampling, the granuloma were straightaway placed in a sterile vial containing a transporting medium prepared accordingly to the PRAS method and delivered to the laboratory within one hour. The direct Gram stained preparation as well as inoculation onto an agar medium were performed. For cultivation of microaerophilic bacteria the material was inoculated onto Columbia and Brucella agar supplemented with 5% sheep blood and Trypticase Soy-Bacitracin-Vancomycin (TBSV) agar (selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*). The incubation was conducted in an anaerobic jar with Campy Pak (BBL), at 37 °C for 4 – 5 days.

The presence of 1 to 3 microaerophilic bacteria strains was demonstrated in 48 (68.6%) of 70 samples. Altogether 66 strains of these bacteria were detected. Gram-negative rods of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* species were selected from 19 samples, the *Capnocytophaga* genus was found in 17 materials and the *Campylobacter* genus was isolated in 12 cases. In 12 materials microorganisms of *Eikenella corrodens* species and in 6 cases Gram-positive rods of *Rothia dentocariosa* species were detected.

Microaerophilic bacteria were found in 48 (68.6%) dental periapical granulomas. Most frequently Gram-negative rods of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* species and of the *Capnocytophaga* genus were isolated.

Adres: dr Elżbieta Zedler

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej AMG

ul. Orzeszkowej 18, 80-208 Gdańsk

e.zedler@amg.gda.pl