

중합효소연쇄반응법을 이용한 급성 치수 및 치근단 질환의 병원성 세균의 동정

김지훈¹ · 유소영^{2,3} · 임선아² · 국중기^{2,3} · 임상수¹ · 박슬희¹ · 황호길^{1,3*}

¹조선대학교 치과대학 보존학교실, ²구강생화학교실, ³구강생물학연구소

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF PUTATIVE PATHOGENS IN ACUTE ENDODONTIC INFECTIONS BY PCR BASED ON 16S rDNA

Jee-Hoon Kim¹, So Young Yoo^{2,3}, Sun-A Lim², Joong-Ki Kook^{2,3}, Sang-Soo Lim¹,
Seul-Hee Park¹, and Ho-Keel Hwang^{1,3*}

¹Department of Conservative Dentistry, ²Department of Oral Biochemistry, and ³Oral Biology
Research Institute, College of Dentistry, Chosun University

The purpose of this study was to investigate the frequency of 7 putative pathogens in endodontic infections. The specimens were collected from infected pulpal tissue of patients who were referred for root canal treatment to the department of conservative dentistry, Chosun University. Samples were collected aseptically using a barbed broach and a paper point. The cut barbed broaches and paper points were transferred to an eppendorf tube containing 500 ml of 1 X PBS. DNAs were extracted from the samples by direct DNA extraction method using lysis buffer (0.5% EDTA, 1% Triton X-100). Identification of 7 putative pathogens was performed by PCR based on 16S rDNA. The target species were as follows: *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola*. Our data revealed that the prevalence of *P. endodontalis* was found in 88.6% (39/54), *P. gingivalis* 52.3% (23/44), *P. nigrescens* 18.2% (8/44), *P. intermedia* 15.9% (7/44), *B. forsythus* 18.2% (8/44), *A. actinomycetemcomitans* 2.3% (1/44), *T. denticola* 25% (11/44) of the samples. The high prevalence of *P. endodontalis* and *P. gingivalis* suggests that they may play an important role in the etiology of endodontic infections.

Key words : 16S rDNA, Acute endodontic infections, PCR, Pathogens

I. 서 론

치수 및 치근단 질환은 치아우식증, 치주 질환과 더불어 구강 내에서 가장 빈번히 발생하는 감염성 질환이다. 치수, 치근단 병변에서 세균의 중요성은 동물 실험과 임상실험을 통해 잘 밝혀졌다. Miller¹⁾는 치수, 치근단 질환에 세균이 관련되어 있음을 처음 제안하였고, 그 후 Kakehashi 등²⁾과 Sundqvist³⁾는 근관 병소가 미생물의 존재와 관계 있다는 것을 보고하였다. 따라서, 이러한 치수 및 치근단 질환의 병인론을 연구하기 위해서는 이에 관련된 세균에 대한 연구가 필수적이라고 할 수 있다.

현재까지 알려진 세균 동정법에는 일반배지나 선택배지에서 분리 배양하여 생화학적으로 검사하는 방법(culture),

DNA-DNA hybridization 법, 세균 종에 대한 특이 항체를 이용하는 방법, 종-특이 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법(PCR), 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 결정법 등이 있다. 예전부터 사용되어 왔던 일반적인 세균 배양법은 많은 시간, 비용, 노동력을 필요하고, 세균을 배양하기 위한 실험 환경을 갖추고 있어야 하므로, 환경에 민감한 세균들을 확인하는데 적합하지 못하다. 따라서, 임상분야에서는 배양이 불가능하거나, 어려운 세균을 동정하는데 분자생물학적 방법을 많이 이용하고 있다. 그들 중 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction(PCR))이 세균을 검출하는데, 민감도 및 특이도가 뛰어나며, 짧은 시간 내에 결과를 확인할 수 있기 때문에⁴⁾, 근래에는 감염된 근관의 세균을 확인하는 연구에서 중합효소연쇄반응법(PCR)이 많이 이용

된다. 특히, 종 수준에서 그 핵산염기서열이 잘 보존된 16S rRNA 유전자에 바탕을 둔 중합효소연쇄반응법(PCR)이 세균의 종 수준에서의 검출 및 동정에 많이 이용되고 있다⁵⁾.

현재까지 치수 및 치근단 질환에 관련된 세균에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. 이러한 연구들의 결과를 살펴보면 *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* 등이 치수 및 치근단 질환에서 빈번하게 관찰되었으며⁶⁻⁹⁾, 이들 중 치수 및 치근단 질환의 급성 증상과 관련된 세균은 주로 *Porphyromonas* 속이라고 몇몇 연구에서 보고되었다¹⁰⁻¹²⁾. 따라서, 본 연구의 목적은 급성 치수 및 치근단 병소에서 존재하는 7종의 병원성 세균의 검출 빈도를 중합효소연쇄반응법을 이용해 조사하여 급성 치수 및 치근단 질환의 역학 조사를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 샘플 채취

조선대학교 치과병원 보존과에 근관치료를 위해 내원한 환자 중 동통, 치근단 방사선 투과상의 크기, 누공의 유무, 근관내 화농성 삼출액의 유무 등을 확인하여 급성 비가역성 치수염과 급성 치근단 농양을 보이는 44개의 치아를 대상으로 시행하였다. 해당 치아를 리버멧으로 격리하고, 치관 부를 3% 과산화수소, 5% iodine으로 1분간 소독하였다. 5% Sodium thiosulfate로 치면의 iodine을 불활성화시킨 다음 근관을 개방한 후, barbed broach 또는 paper point를 이용하여 근관 내 내용물을 채취하고, 1 ml의 1X PBS

에 담아 실험실로 옮기거나 -20℃에 얼려서 다음의 실험에 이용할 때까지 보관하였다.

2. 세균 genomic DNA 추출

위에서 채취한 샘플을 10,000x g의 원심력을 이용하여 수확하고, 이를 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(Intron co, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 지놈 DNA를 추출하였다. 이를 간략하게 설명하자면 다음과 같다. 세균을 수확한 다음 50 μl의 Pre-incubation solution과 3 μl의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 μl의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65℃에서 15분간 반응시키고, 250 μl의 Binding solution을 넣고 잘 혼합하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 10,000x g에서 1분간 원심분리한 후, Column에 500 μl의 washing buffer A를 넣어 다시 1분간 원심분리 하였다. 여기에 500 μl의 washing buffer B를 넣어 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣어 100 μl의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 10,000x g에서 1분간 원심분리 하였다.

3. 중합효소연쇄반응

본 연구에서는 기존에 치수질환과 밀접한 연관이 있다고 보고된 *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* 등 총 7종의 세균에 대해 사용할 중합효소연쇄반응 프라이머는 Table 1과 같다. 이때 채취한 시료는 약 1,000배 또는

Table 1. PCR primer pairs used for detection of putative oral pathogens in samples

Species	Primer pairs (5'→3')	Size of amplicon
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	GCTGCAGCTCAACTGTAGTC CCGCTTCATGTCACCATGTC	672 bp
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG ACTGTTAGCAACTACCGATGT	406 bp
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATGAAACAAAGGTTTCCGGTAAG CCCACGTCTCTGTGGGCTGCCGA	804 bp
<i>Prevotella intermedia</i>	TTTGTGGGGAGTAAAGCGGG TCAACATCTCTGTATCCTGCGT	575 bp
<i>Treponema denticola</i>	TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT TCAAAGAAGCATTCCTCTTCTTA	316 bp
<i>Bacteroides forsythus</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA TGCTTCAGTGTGAGTTATACCT	641 bp
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC ATGCCAACTTGACGTTAAAT	557 bp

Table 2. Prevalence of some bacterial species in infected root canals

species	Acute Pulpitis(N*=24)(%)	Acute Periapical Abscess(N=20)(%)	Total(N=44)(%)
Pe	21(87.5)	18(90)	39(88.6)
Pg	16(66.7)	7(35)	23(52.3)
Pn	2(8.3)	6(30)	8(18.2)
Pi	1(4.2)	6(30)	7(15.9)
Td	5(20.8)	6(30)	11(25)
Bf	3(12.5)	5(25)	8(18.2)
Aa	0(0)	1(5)	1(2.3)
Total	21(87.5)	18(90)	39(88.6)

Pe : *Porphyomonas endodontalis*,

Pn : *Prevotella nigrescens*,

Td : *Treponema denticola*,

Aa : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Pg : *Porphyomonas gingivalis*

Pi : *Prevotella intermedia*

Bf : *Bacteroides forsythus*

*n : Sample number

10,000배로 희석한 후 PCR premix(Bioneer, Daejeon, Korea)에 각각의 프라이머 쌍(최종 1 μM 농도)을 넣고 PTC-200 중합효소연쇄반응기(MJ research, USA)를 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 이때 반응조건은 다음과 같았다: 초기 변성은 95℃에서 10분간 시행하고, 95℃에서 0.5분간 변성, 55℃또는 65℃에서 0.5분간 재결합, 72℃에서 1분간 핵산 합성의 3 단계를 35회 반복시행하고, 마지막 핵산 합성단계를 72℃에서 10분간 시행하였다. 중합효소연쇄반응의 시행 후에 그 반응물을 1.5% 아가로스 젤 상에서 전기영동을 시행하고 예상되는 증폭물의 크기와 비교하여 해당 세균 종의 존재 유무를 결정하였다.

III. 결 과

실험된 44개 치아의 분석 결과는 Table 2에 나타나 있다. 본 실험에서 중합효소연쇄반응 결과는 44개의 샘플 중 39개(88.6%)에서 세균이 검출되었다. *P. endodontalis*는 39개의 샘플(88.6%)에서 나타났고, *P. gingivalis*에서는 23개(52.3%), *P. nigrescens*에서는 8개(18.2%), *P. intermedia*에서는 7개(15.9%)에서 나타났다. 또한, *T. denticola*는 44개 샘플 중 11개(25%)에서, *B. forsythus*는 8개(18.2%), *A. actinomycetemcomitans*는 1개(2.3%)에서 나타났다. 급성 치수염을 갖는 24개의 샘플에서는 *P. endodontalis*가 87.5%로 가장 많이 나타났고, *P. gingivalis*는 66.7%, *P. nigrescens*는 8.3%, *P. intermedia*는 4.2%, *B. forsythus*는 12.5%, *T. denticola*는 20.8%로 나타났다. 그러나 *A. actinomycetemcomitans*는 검출되지 않았다(Table 2).

또한, 급성 치근단 농양을 갖는 20개의 샘플에서는 *P. endodontalis*가 90%로 가장 많이 나타났고, *P. gingivalis*는 35%, *P. nigrescens*는 30%, *P. intermedia*는 30%, *B. forsythus*는 25%, *T. denticola*는 30%, *A. actinomycetemcomitans*는 5%로 나타났다(Table 2).

IV. 총괄 및 고안

*P. endodontalis*는 black-pigmented Bacteroides (BPBs) 종의 하나로 치수 및 치근단 질환에서 많이 발견되는 세균이다¹³⁾. Oliveira 등¹⁴⁾은 감염 근관의 52.6%에서 *P. endodontalis*가 검출되었음을 보고하였고, Van Winkelhoff¹⁵⁾과 Wahlfors¹⁶⁾등은 치근단 농양의 90%정도에서 *P. endodontalis*가 발견되었다고 보고하였다. 또한 여러 연구에서 *P. endodontalis*가 급성 증상과 관련이 있다고 보고되었다^{3,16,17)}. 본 연구의 결과에서도 *P. endodontalis*가 88.6%로 가장 많이 검출되었다. 이와 같이, 급성 증상이 있는 치수, 치근단 질환에서 *P. endodontalis*가 높은 비율로 관찰되는 것은 그것이 급성 치수, 치근단 질환의 중요한 원인인자일 수 있다는 사실을 말해주는 것으로 생각된다.

*P. gingivalis*는 파괴성 치주염과 관련이 있으나, 치수 및 치근단 질환에서도 많이 관찰되는 세균이다. 여러 연구를 살펴보면 치수 및 치근단 질환에서 *P. gingivalis*는 5~65%로 다양하게 나타난다^{11,16,18)}. Sundqvist 등⁸⁾과 Haapasalo 등¹⁰⁾은 *P. gingivalis*가 *P. endodontalis*와 함께 급성감염이 있는 근관에서 주로 발견되었다고 하였다. Hashioka 등¹⁹⁾은 *P. gingivalis*가 아급성의 감염과 관련

되어 나타나며, 타진에 대한 민감성, 악취와 관련이 있다고 하였다. 본 연구에서는 *P. gingivalis*가 52.3%로 *P. endodontalis*와 함께 가장 많이 검출되었다. 실험 결과에서 다양한 차이를 보이는 것은 세균을 검출하는 방법이 다르기 때문이며, culture를 이용한 예전의 연구에서는 낮은 발현 빈도를 보이는 반면, 최근 이 연구에서는 높은 발현 빈도를 보이고 있다. 이들의 결과를 볼 때, *P. gingivalis*는 *P. endodontalis*와 함께 치수 및 치근단 질환의 원인균일 가능성이 있다고 사료된다.

*P. nigrescens*는 Shah와 Gharbia²⁰⁾에 의해서 *P. intermedia*로부터 새로운 종으로 분리 독립되었다. 그 이후로 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*의 구강 내 질병 유무 및 질병 종류에 따른 발현 빈도에 대한 비교 연구가 많이 진행되었다. Gharbia 등²¹⁾은 *P. intermedia*는 치주 병소에서 주로 나타나며, *P. nigrescens*는 근관 병소에서 주로 나타난다고 보고하였다. 그 외의 많은 연구에서도 *P. intermedia*는 급성 치주 질환에서 많이 나타나는 반면, *P. nigrescens*는 치수 및 치근단 질환이나 치은염과 관련되어 나타난다고 보고하였다^{22,25)}. 본 연구에서는 *P. nigrescens*가 18.2%로 나타났고, *P. intermedia*가 15.9%로 나타나 치수 및 치근단 질환에서 두 세균 종들의 발현 빈도는 비슷한 양상을 보였다(Table 2). *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*가 급성 증상과 관련이 있다고 알려진 반면, 일반적으로 *P. intermedia*와 *P. nigrescens*는 급성 증상과 무 증상에서 두루 발견된다고 알려져 있다^{10,12,13)}. 본 연구의 결과를 볼 때, 이들 세균이 증상과 어느 정도 관련이 있기는 하나, 확실한 관련성을 밝히기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

*T. denticola*는 oral spirochetes의 일종으로, 심한 치주 질환과 연관되어 나타난다고 알려져 있다⁷⁾. 하지만, oral spirochetes도 1950년대부터 감염 근관에서 발견되었다는 보고가 있었다^{26,29)}. 최근에 Siqueira 등³⁰⁾은 치수 및 치근단 질환에서 *T. denticola*가 17.9% 발견되었다고 보고하였다. Rôças 등³¹⁾은 *T. denticola*가 감염근관의 44%에서 발견되었다고 보고하였다. *T. denticola*는 다양한 독력인자를 가지고 있어 감염을 일으킬 수 있는 세균이라고 보고되었다³²⁾. 본 연구에서는 샘플의 25%에서 *T. denticola*가 발견되었고, 이것은 *T. denticola*가 치수 및 치근단 질환을 일으킬 수 있는 가능성이 있다는 것을 보여주는 것으로 생각된다. 그러나 *T. denticola*가 확실한 치수 및 치근단 질환의 주 원인균인지는 더 많은 연구를 통해 고찰되어야 할 것으로 사료된다.

*B. forsythus*는 배양이 어렵기 때문에 과거의 세균배양으로는 거의 발견되지 않아 치주질환의 원인균으로만 생각되었다. 그러나 최근에 세균을 확인하는데 민감도가 높은 종합효소연쇄반응법이 개발되면서 *B. forsythus*가 치수 및

치근단 질환에서도 발견됨이 확인되었다^{33,34)}. Siqueira 등³⁰⁾은 감염근관의 20%에서 *B. forsythus*가 발견되었다고 보고하였다. 또 다른 연구에서는 감염근관의 29.6%에서 *B. forsythus*가 발견되었다고 보고하였다³⁵⁾. 본 연구에서도 치수 및 치근단 질환의 18.2%에서 *B. forsythus*가 나타나 앞선 연구의 결과와 비슷하였다. *B. forsythus*는 단독으로 감염을 일으키지 못한다고 보고되고 있다. Takemoto 등³⁶⁾은 동물실험에서 *B. forsythus*가 *P. gingivalis*와 함께 존재할 때, 높은 독성을 보였다고 하였다. 본 연구에서도, *B. forsythus*만 따로 나타난 샘플은 없었고, 항상 *P. endodontalis*와 함께 나타났다. 이러한 결과를 볼 때, *B. forsythus*는 다른 세균과의 synergism을 통해 치수 및 치근단 질환의 진행에 직접적 또는 간접적으로 관여하는 것 같으나, 주 원인균으로 생각하기는 어렵다고 사료된다.

*A. actinomycetemcomitans*는 치주질환의 원인균으로 알려져 있다³⁷⁾. 몇몇 연구에서 *A. actinomycetemcomitans*가 치수 및 치근단 질환에서 드물게 발견되기도 한다고 보고했으나^{38,39)}, 치수 및 치근단 질환에서 발견되지 않았다고 보고한 연구도 많다³⁰⁾.

본 연구에서는 *A. actinomycetemcomitans*가 1개의 (2.3%) 샘플에서 발견되었다. 이러한 사실은 *A. actinomycetemcomitans*가 치수 및 치근단 질환에 발견되기는 하였으나, 관련이 있는 세균이라고 보기는 어렵다는 것을 말해주는 것으로 생각된다. 본 연구의 질환에 따른 세균을 비교시 *P. gingivalis*는 치근단에 abscess가 생성되기 전 치수염 병소에서 유의성 있게 더 많이 검출되는 경향을 보였다. 반면에 *P. intermedia*, *P. nigrescens* 및 *B. forsythus*는 치근단에 농양이 생성된 병소에서 더 많이 검출되는 경향을 보였으나, *P. intermedia*만 유의성 있는 차이가 있었다. 이는 *P. gingivalis*가 *P. intermedia*, *P. nigrescens* 및 *B. forsythus*보다는 먼저 치수염의 진행에 관여를 하는 것으로 사료된다. 종합효소연쇄반응을 이용한 본 연구 결과를 종합할 때, 기존의 보고들과 일치하게 여러 잠재적 병원성 세균이 급성 치수 및 치근단 질환에서 검출되었으며, 이는 치수 및 치근단 질환이 여러 세균에 의해 발병 및 진행이 된다는 것을 의미한다고 사료된다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 치수 및 치근단 병소에서 존재하는 7종의 병원성 세균의 검출 빈도를 조사하여 치수 및 치근단 질환의 역학조사를 위한 기초자료로 활용하고자 하였다. 세균의 분포를 조사하기 위해서 급성 치수 및 치근단 감염을 보이는 44개의 치아를 대상으로 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플에서 세균 genomic DNA를 추출하여, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T.*

denticola, *B. forsythus*, *A. actinomycetemcomitans* 7종의 세균에 대하여 중합효소연쇄반응법을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 치수 및 치근단 질환에서 채취한 샘플 중 88.6%에서 적어도 1종의 세균을 검출할 수 있었다.
2. 치수 및 치근단 질환에서 가장 많이 발견되는 세균은 *P. endodontalis*(88.6%), *P. gingivalis*(52.3%)이었다.
3. 그 외의 세균은 *T. denticola*(25%), *P. nigrescens*(18.2%), *B. forsythus*(18.2%), *P. intermedia*(15.9%), *A. actinomycetemcomitans*(2.3%) 순으로 발견되었다.
4. 급성 비가역성 치수염에서는 상대적으로 *P. gingivalis*가 많이 검출되었으며, 급성 치근단 농양에서는 상대적으로 *P. intermedia*가 많이 검출되었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, *P. endodontalis*와 *P. gingivalis*가 치수 및 치근단 질환에 가장 많이 검출되는 세균으로서, 치수 및 치근단 질환에 중요한 원인균이라 사료된다.

참고문헌

1. Miller WD. Microorganisms of the human mouse. Philadelphia: S.S. White Dental Co., 1890.
2. Kakehashi S, Stanley HR and Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 20:340-349, 1965.
3. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps, Umea: Umea University, 1976.
4. Brown TA. Molecular biology labfax II. San Diego: Academic press, 1998.
5. Ashimoto A, Chen C, Bakker I and Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesion. *Oral. Microbiol. Immunol* 11: 56-61, 1996.
6. Brook I, Frazier EH and Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral. Microbiol. Immunol* 6: 123-125, 1991.
7. Socransky SS and Haffajee AD. Clinical periodontology and implant dentistry, 3rd eds. Copenhagen: Munksgaard, 138-188, 1997.
8. Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP and Sjogren UF. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infect Immun* 25: 685-693, 1979.
9. Van Winkelhoff AJ, Carlee AW and De Graaff J. Bacteriodes endodontalis and others black-pigmented Bacteriodes species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 49: 494-498, 1985.
10. Haapasalo M, Ranta H, Ranta K and Shah H. Black-pigmented bacterioides spp. in human apical periodontitis. *Infect Immun* 53: 149-153, 1986.
11. Siqueira JF, Rôças IN, Oliveira JCM and Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 27: 563-566, 2001.
12. Sundqvist G, Johansson E and Sjögen U. Prevalence of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 15:13-19, 1989.
13. Van Winkelhoff AJ. The role of black-pigmented bacterioides in human oral infections. *J Clin Periodontol* 15:145-155, 1988.
14. Julio Cezar Machado de Oliveira, José Freitas Siqueira Jr, Gabriela B. Alves Raphael Hirata Jr, Arnaldo FB and Andrade. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed Polymerase chain reaction. *J Endod* 26:729-732, 2000.
15. Wahlfors J and Meurman JH. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. *J Dent Res* 74: 1796-1801, 1995.
16. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS and Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 25: 413-415, 1999.
17. Haapasalo M. Bacterioides spp. in dental root canal infections. *Endod Dent Traumatol* 5: 1-10, 1989.
18. Siqueira JF, Rôças IN, Oliveira JCM and Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed Polymerase chain reaction. *J Endod* 27:164-167, 2001.
19. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba, N and Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 18: 558-561, 1971.
20. Shah HN and Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 542-546, 1992.
21. Gharbia SE, Haapasalo M and Shah HN. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infection. *J Periodontol* 65: 56-61, 1994.
22. Conrads G, Mutters R, Fischer J, Brauner A, Lutticken R and Lampert F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. *J Periodontol* 67: 995-1003, 1996.
23. Dahlén G, Wikström M, Renvert S, Gmür R. and Guggenheim B. Biochemical and serological characterization of Bacterioides intermedius strains isolated from the deep periodontal pocket. *J Clin Microbiol* 28: 2269-2274, 1990.
24. Mättö J, Asikainen S and Väisänen ML. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. *Clin Infect Dis* 25 Suppl: S194-S198, 1997.
25. Milson SE, Sprague SV, Dymock D, Weighman AJ and Wade WG. Rapid differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* by 16S rDNA PCR-RFLP. *J Med Microbiol.* 44: 41-43, 1992.
26. Dahle UR, Tronstad L and Olsen I. Observation of an unusually large spirochete in endodontic infection. *Oral Microbiol and Immunol* 8: 251-253, 1993.
27. Hampf, EG. Isolation and identification of spirochetes obtained from unexposed canals of pulp-involved teeth. *Oral Surg Oral Med and Oral Pathol* 10: 1100-1104,

- 1957.
28. Thilo BE, Bachni P and Holz J. Darkfield observation of bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *J Endod* 12: 202-205, 1986.
 29. Trope M, Tronstad L, Rosenberg ES and Litsgarten MA. Darkfield microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. *J Endod* 14: 35-39, 1984.
 30. Siqueira JF, Rôças IN, Moraes SR and Santos KRN. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *Int Endod J* 35: 345-351, 2002.
 31. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN and Coelho M.A. "Red complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral Radiol Endod* 91: 468-471, 2001.
 32. Fenno JC and McBride BC. Virulence factor of oral treponemes. *Anaerobe* 4: 1-17, 1998.
 33. Gonçalves RB and Mouton C. Molecular detection of bacteriodes forsythus in infected root canals. *J Endod* 25: 336-340, 1999.
 34. Conrads G, Gharbia SF, Gulabivala K, Lampert F and Shah HN. The use of a 16S rDNA PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 23: 433-438, 1997.
 35. Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, De Uzeda M and Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 92: 451-457, 2001.
 36. Takemoto T, Kurihara H and Dahlen G. Characterization of *Bacteriodes forsythus* isolates. *J Clin Microbiol* 35: 1378-1381, 1997.
 37. Meyer DH and Fives-Taylor PM. The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. *Tren In Microbiol* 5: 224-228, 1997.
 38. Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M and Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral. Radiol. Endod* 89: 744-748, 2000.
 39. Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO and Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 16: 191-196, 2000.

황 호 길

조선대학교 치과병원 보존학교실
 광주광역시 동구 서석동 421번지
 Tel : 062-220-3846 Fax : 062-232-9064
 E-mail : rootcanal@hanmail.net