
Mikroorganismer periapikalt – finnes de?

P. T. SUNDE, L. TRONSTAD OG I. OLSEN

Innledning

Apikal periodontitt er en immuninflammatorisk sykdom med mikrobiell etiologi¹. Den apikale prosessen er først og fremst et resultat av vertsforsvarets respons mot mikrobene og deres produkter i den nekrotiske rotkanalen.

Munnhulen inneholder en av de mest konsentrerte akkumuleringer av mikroorganismer i menneskekroppen, med et estimat på ca 700 arter. Anaerobe dyrkningsteknikker og prøvetaking, samt gode identifiseringsmetoder har gitt mye informasjon om de mikrobielle komplekser som er assosiert med endodontisk infeksjon. Bakteriene som er påvist i nekrotiske kanaler på tenner med apikal periodontitt utgjør en liten andel av den totale orale mikroflora. I den nekrotiske kanalen vil man få en gradvis økning av strikte anaerobe arter som *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* og *Actinomyces*.

Ved hjelp av molekylære teknikker har man i de senere år funnet at bakterier som er svært vanskelige å dyrke, slik som *Treponema*, *Tannerella forsythensis* og *Olsenella*-arter, er tilstede i nekrotiske kanaler i langt høyere antall enn det som tidligere er beskrevet. I tillegg har man ved molekylærbiologiske metoder påvist tidligere uidentifiserte og ikke dyrkbare bakteriearter².

Bakterier i rotkanalen på terapiresistente tenner inneholder derimot en annen flora enn den som er beskrevet i den nekrotiske kanalen, med langt større andel av gram-positive og fakultative

arter. Mikrober som vanligvis ikke er tilstede i nekrotiske kanaler slik som *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter* og *Candida albicans*, er også ofte påvist.

Ekstraradikulær infeksjon

Målet med endodontisk behandling er å eliminere og forhindre utvikling av apikal periodontitt. I de fleste tilfeller vil en endodontisk infeksjon respondere godt på konvensjonell endodontisk behandling. Når rotkanalen er fullstendig instrumentert, desinfisert og obturert, viser studier at på tenner med asymptomatisk apikal periodontitt tilheler rundt 80-90% av lesjonene. Det vil si at ca 10-20% ikke responder på behandling. I disse tilfellene vil bakterier som er resistente mot terapi og/eller vertens forsvar overleve i rotkanalsystemet og/eller i den periapikale lesjonen, og tilheling vil ikke finne sted.

Bakteriene i endodontisk sykdom befinner seg hovedsakelig i rotens hovedkanal, men det er velkjent at bakteriene i kanalen kan spre seg til bikanaler og dentinkanaler til omgivende dentin. Det var lenge en oppfatning at den periapikale lesjonen var bakteriefri. Kun ved akutte abscesser, eksaserbasjoner og osteomyelitt trodde man at bakteriene var i stand til å spre seg til den periapikale lesjonen.

Flere studier viste derimot at ved langvarige infeksjoner hvor en permanent flora var etablert i rotkanalen, kunne en invasjon i den periapikale lesjonen finne sted, selv på asymptomatiske tenner. Det er særlig *Actinomyces*-arter og *Propionibacterium propionicum* som har vært forbundet med terapieresistente asymptomatiske lesjoner³. Disse bakteriene kan etablere seg utenfor rotkanalen i den periapikale lesjonen, uavhengig av den intraradikulære flora.

Ekstraradikulær infeksjon på asymptomatiske tenner har lenge vært et kontroversielt tema. Kan andre arter enn *Actinomyces* og *P. propionicum* leve i den periapikale lesjonen? Tronstad *et al*⁴ vi-

ste ved bruk av anaerobe dyrkningsteknikker at mange forskjellige bakteriearter, både anaerobe og fakultative, kunne etablere seg periapikalt. Etter disse observasjonene har en rekke studier gjort tilsvarende funn.

Mye av usikkerheten omkring ekstraradikulære infeksjoner ligger i den kirurgiske teknikken som er brukt for å isolere den periapikale lesjonen. Det er svært viktig at lesjonene ikke blir kontaminert av bakterier fra den øvrige munnhulefloraen. Den kirurgiske prosedyren må være standardisert og utført så aseptisk som det lar seg gjøre. Metodestudier har vist at kontaminering er et minimalt problem under kontrollerte, aseptiske forhold. Disse studiene har i tillegg vist at kirurgiske snitt hvor man unngår mikrofloraen i gingivalsulcus er den beste teknikken for å undersøke periapikale lesjoner^{5,6,10}.

For å påvise og identifisere bakterier fra periapikale lesjoner er det benyttet forskjellige typer teknikker: anaerob dyrkning med databasert biokjemisk identifisering, elektronmikroskopi og molekylærbiologiske teknikker slik som DNA-DNA hybridisering og fluoriserende in situ hybridisering (FISH).

Studier hvor man har gjort anaerob dyrkning finner at 70-90% av de periapikale lesjonene på asymptomatiske tenner inneholder bakterier, med gjennomsnittlig 1-10 bakterier per lesjon. De vanligste bakteriene som er isolert er organismer som også er vanlige i nekrotiske rotkanaler, slik som *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces* og *Peptostreptococcus*-arter^{5,7}.

Tenner som har blitt behandlet med kalsiumhydroksyd i mer enn seks måneder kan ha en noe annerledes flora enn den som er nevnt ovenfor. I disse lesjonene er det funnet økt andel av fakultative gram positive arter (ca. 70%), og organismer som *Staphylococcus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* og *C. albicans* er vanlig forekommende⁸. Dette er i overenstemmelse med funn fra rotkanalen på rotfylte terapiresistente tenner, hvor *C. albicans* og *E. faecalis* ofte kan påvises. Disse organismene har mekanismer for å overleve i miljøer hvor andre bakteriearter vil dø. In vitro-studier har blant annet vist at slike organismer kan være

resistente mot den antibakterielle effekten av kalsiumhydrok-syd⁹.

Med DNA-DNA hybridisering er det funnet langt flere bakterier per lesjon enn ved anaerob dyrkning^{6,10}. Denne teknikken kan identifisere bakterier som er svært vanskelige å dyrke og som er tilstede i så lavt antall at de ikke kan påvises med konvensjonell dyrkning. De vanligste bakteriene som har blitt identifisert med DNA-DNA hybridisering er de samme som er funnet ved anaerob dyrkning; *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Campylobakter* og *Peptostreptococcus*-arter. I tillegg har bakterier som *T. forsythensis*, treponemer og *Actinobacillus actinomycetemcomitans* blitt påvist i et høyt antall av lesjonene. Dette er bakterier som er velkjente i periodontal sykdom, men som i de senere år også er blitt funnet hyppig i endodontisk sykdom ved bruk av molekylære teknikker. *T. forsythensis* er svært vanskelig å dyrke med konvensjonelle metoder, og ble første gang påvist i rotkanalen i 1997. Treponemer har i mange år vært oversett som endopatogener fordi disse organismene også er svært vanskelige å påvise med konvensjonelle metoder. Det er først i de senere år at man ved hjelp av molekylærbiologiske metoder har bekreftet at de kan være tilstede i høyt antall i endodontisk sykdom. Treponemene, som tilhører *Spirochaetaceae*-familien er unike blant bakterieartene på grunn av sin morfologi. Interne flageller gjør at de kan bevege seg i et høyviskøst medium. Det er derfor mulig for dem å etablere seg på steder som er lite egnet for vekst, og de har blitt påvist dypt inne i bindevev.

Ved hjelp av FISH er det blitt observert og identifisert bakterier direkte i den periapikale lesjonen¹¹. Denne teknikken kombinerer molekylærbiologisk teknologi med den visuelle informasjonen mikroskopet gir, noe som gjør det mulig å påvise og identifisere bakteriene i sitt „naturlige“ miljø. Teknikken er basert på hybridisering av merkede prober med ribosomalt RNA inne i en morfologisk intakt bakteriecelle. Ved bruk av et konfokalmikroskop som gjør det mulig å se den tredimensjonale strukturen på vevet, ble det bekreftet at bakteriene lå i forskjellige lag i det periapikale

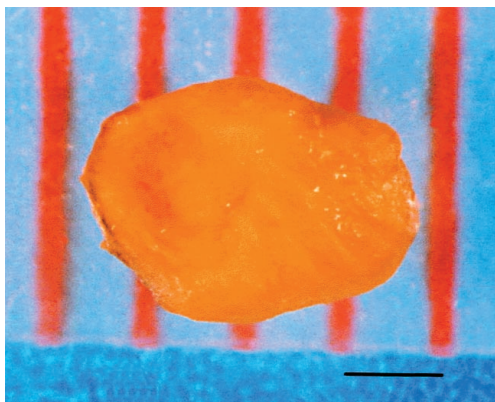
vevet. I noen lesjoner var bakteriene spredt mellom celler og fibre, mens i andre lesjoner ble bakteriene observert organisert i mikrokolonier. Felles for alle lesjonene undersøkt med FISH var at bakteriene var lokalisert til avgrensede områder, mens store områder i vevet var totalt bakteriefri. *T. forsythensis*, *Treponema vincentii*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* og *Streptococcus* ble identifisert med denne teknikken. Med en universell probe rettet mot alle typer bakteriearter ble det påvist mange bakterier med forskjellig morfologi, både kokker, staver og spiroketer. I tillegg ble det observert svært lange bakterier med atypisk morfologi, noe som er med på å bekrefte at mye ennå er ukjent innen endodontisk mikrobiologi.

Biofilm på rotoverflater og i periapikalt vev

Dentalt plakk er en mikrobiell biofilm. En biofilm er definert som en populasjon av bakterier omsluttet av en matriks hvor bakteriene er festet til hverandre og/eller til flater/vev. Bakterier som lever i en biofilm utgjør et unikt „samfunn“ som gir dem mange fordeler. Det har blant annet vært vist at bakterier som vokser i biofilm kan være 1 000-1 500 ganger mer resistent mot antimikrobielle midler enn de samme bakteriene hvis de lever alene (planktoniske). I tillegg har det vært vist at bakterier i biofilm kan kommunisere på cellenivå, de kan bytte genetisk materiale, og de kan være mer patogene gjennom økt uttrykk av virulensfaktorer.

Bakterier kan danne biofilm på rotoverflater

Elektronmikroskopiske studier av rotspisser og ekstruderte guttaperkapoints fra terapiresistente tenner beskriver bakterier som er omgitt av et ekstracellulært materiale¹². Det er svært sannsynlig at biofilm som dannes på rotoverflater er en viktig faktor for manglende tilheling av periapikale lesjoner.



Figur 1. Svovelkorn fra terापiresistent apikal lesjon. Granulen var bløt, gul i fargen, og 3-4 mm Ø. Mål = 10µm.

Svovelkorn har blitt isolert fra periapikale lesjoner på terापiresistente tenner⁸ (se Figur 1). Disse kornene hadde en størrelse på 3-4 mm i diameter og varierende hardhetsgrad. Svovelkorn er tidligere beskrevet i puss fra aktinomykotiske lesjoner (spesielt cervikofacial aktinomykose). Aktinomykose er en kronisk, granulomatøs infeksjon karakterisert med abscessformasjon og fistler som tømmer seg på hudoverflaten. Pusset inneholder svovelkorn som er små kolonier med bakterier. Kornene har fått sitt navn pga. sin gule farge, selv om de ikke inneholder svovel i det hele tatt. *A. israelii* har vært beskrevet som hovedbakterien i svovelkorn isolert fra cervikofacial aktinomykose. Ved dyrkning av de periapikale granulene derimot, ble det i tillegg til *A. israelii* også isolert *A. naeslundii*, *A. viscosus* og *A. meyeri*. I tillegg til *Actinomyces*-artene ble andre bakteriearter slik som *P. aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Clostridium* og *Streptococcus* isolert. Det ser ut til at *Actinomyces*-arter har en spesiell rolle i utviklingen av svovelkorn. Som i dentalt plakk, så er disse organismene sannsynligvis pionér-bakterier som danner miljøer hvor også andre bakteriearter kan leve. *P. aeruginosa* og *Staphylococcus* er bakterier som ikke er tilstede i munnhulen under friske forhold, men som i enkelte tilfeller slår seg ned og overlever, muligens fordi de har evnen til å danne biofilm, hvor de er godt beskyttet. Elektronmikroskopiske undersøkelser viste at svovelkornene var



Figur 2. Elektronmikroskopisk bilde av snittflaten på et svovelkorn viser en tett sammenpakking av stav- og spiralformede bakterier. Ekstracellulært materiale kan sees mellom cellene. Mål = 5 μm .

tettpakket av bakterier omgitt av et ekstracellulært materiale. Bakteriene hadde forskjellig morfologi, med spesielt mange stav- og spiralformede bakterier (spiroketer) (se Figur 2). Tilstedeværelsen av strikte anaerobe arter slik som spiroketer antyder at disse svovelkornene har mikromiljøer med lite oksygen. Svovelkornene viste at bakterier periapikalt kan organisere seg i biofilm, hvor de er godt beskyttet mot vertsforsvaret og antimikrobielle midler. Svovelkorn er sannsynligvis svært avgjørende for manglende tilheling av den periapikale lesjonen.

Patogenisitet

Den periapikale lesjonen er et granulasjonsvev som inneholder mange immunologiske celler, og det er diskutert hvordan bakterier kan overleve i et slikt „bakteriefientlig“ miljø.

Mange mikrober har utviklet forskjellige strategier for å unngå vertsforsvaret og etablere sine egne nisjer i det miljøet de lever i. Noen bakterier inhiberer fagocytose, mens andre patogene modifierer den inflammatoriske responsen for å unngå å bli drept.

Man vet at metabolismen fra pionerbakterier i dental biofilm gir vekstvilkår for flere anaerober. I et slikt miljø vil oksygentilførselen stadig minske, noe som igjen vil favorisere strikte anaerobe arter som *T. forsythensis* og treponemer. Et oksygenfattig apikalt miljø og tilstedeværelse av anaerobe arter vil føre til redusert PMN fagocytose. Mange patogene anaerober produserer spesifikke molekyler, som kan inhibere kjemotakse av immunologiske celler og interferere med deres mulighet til å drepe eller fagocytosere bakterier. Disse enzymene interfererer ikke bare med fagocytose, men gjør det også mulig for patogene anaerober å tåle noe oksygeneksponering. Mange endopatogener kan i tillegg produsere spesifikke proteaser, som kan degradere komponenter i immunresponsen inkludert immunglobuliner, komplement og cytokiner. Den periapikale lesjonen er sannsynligvis ikke så bakteriefientlig som man tidligere har trodd.

Det er som nevnt påvist mange forskjellige bakteriearter periapikalt, men ingen enkeltstående bakterie kan sees på som hovedpatogen i endodontisk sykdom. Sykdomsutviklingen er et resultat av samarbeidet mellom bakteriene. Det er sannsynlig at de bakteriene som er hyppig til stede, har mange virulensfaktorer og som også er forbundet med periodontal sykdom er viktige i patogenesen, men vi kan ikke utelukke at selv de lav-virulente bakteriene har en spesiell rolle¹³. Vi vet at mange bakterier som i utgangspunktet er lav virulente kan bli mer patogene ved å leve sammen med andre bakteriearter. Det gjenstår mye forskning før den endodontiske mikroflora er fullstendig kartlagt, og før vi vet hvilken rolle hver enkelt bakterie har i patogenesen.

Konklusjoner

Mange forskjellige bakteriearter er påvist i periapikale lesjoner på asymptotiske rotfylte tenner. Flere bakterier er funnet med molekylærbiologiske teknikker enn med dyrkning. Det ser ut til at bakteriene lever i avgrensede områder i lesjonene, ofte i form av mikrokolonier. Bakteriene kan også danne biofilm, f.eks. i sovelkorn, hvor de er godt beskyttet mot vertens forsvar og antimikrobiell behandling.

På tenner som er behandlet med kalsiumhydroksyd i mer enn seks måneder finner man en mikroflora som er dominert av gram-positive organismer, hvor mange har vist seg å være terapiresistente.

Det er også påvist bakterier med molekylærbiologiske teknikker som man ikke ennå har greid å identifisere og dyrke.

LITTERATUR

- 1 Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umeå University Odontological Dissertations No. 7, 1976.
- 2 Significance of bacterial identification by molecular biology methods. Spratt DA. Endodontic Topics 2005, 9: 4-14.
- 3 Happonen R-P. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. Endod Dent Traumatol 1986; 2: 205-209.
- 4 Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. Endod Dent Traumatol 1987; 3: 86-90.
- 5 Sunde PT, Olsen I, Lind PO, Tronstad L. Extraradicular infection: a methodological study. Endod Dent Traumatol 2000; 16: 84-90.
- 6 Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. Endod Dent Traumatol 2000; 16: 197-204.
- 7 Iwy C, Macfarlane TW, Mackenzie D, Stenhouse D. The microbiology of periapical granulomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990; 69: 502-505.

- 8 Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28: 304-10.
- 9 Gram-positive organisms in endodontic infections. Chávez de Paz LE. *Endodontic Topics* 2005; 9: 79-96.
- 10 Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 191-196.
- 11 Sunde PT, Olsen I, Göbel UB, Theegarten D, Winter S, Debelian GJ, Tronstad L, Møter A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology* 2003; 149: 1095-1102.
- 12 Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 73-77.
- 13 Olsen I, Dahlén G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2005; 9: 15-26.