



Original Article

Real-time PCR을 이용한 임플란트주위염 원인균의 정량적 분석

김민정¹ · 한경순^{1,2}

¹가천대학교 보건대학원 치위생학과 · ²보건과학대학 치위생학과

Quantitative detection of peri-implantitis bacteria using real-time PCR

Min-Jung Kim¹ · Gyeong-Soon Han^{1,2}

¹Department of Dental Hygiene, Graduate School of Gachon University

²Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Gachon University

Corresponding Author: Gyeong-Soon Han, Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Gachon University, 191 Hambakmoero, Yeonsu-gu, Incheon, 21936, Korea. Tel : +82-32-820-4372, Fax : +82-32-820-4370, E-mail : gshan@gachon.ac.kr

ABSTRACT

Objectives: This study was conducted to analyze peri-implantitis bacteria and identify their associations with health status and health activities. **Methods:** Gingival sulcus fluid at the implant's periodontal pockets sampled from the participants were analyzed by multiplex real time PCR. **Results:** Participants had strains in the order of 100% *F. nucleatum*, 98.0% *E. corrodens*, and 96.0% *P. micra*, and the correlation between *C. rectus* and *E. nodatum* was high ($p < 0.01$). Diabetic group (*P. gingivalis*, *P. nigrescens*) hypertension (*P. nigrescens*), group with four or more periodontal pockets (*P. gingivalis*, *T. dentica*, *P. intermedia*, *E. nodatum*, and *C. rectum*), smoking (*P. micra*, *E. corrodens*), drinking (*T. dentola*), and scaling groups (*C. rectus*) were found to have more strains ($p < 0.05$). **Conclusions:** Representative pathogenic microorganisms detected in periodontal pockets of implants were similar to dental periodontal pockets; however there were differences in the amount and distribution of microorganisms, and they were affected by health status and health behavior.

Key Words: Multiplex real-time PCR, Oral pathogenic microorganisms, Peri-implantitis

색인: 구강병원성 미생물, 다중 실시간 중합효소 연쇄반응법, 임플란트주위염

서론

임플란트는 상실된 치아를 수복하는 치료방법으로, 주변 치아의 손상 없이 자연치아와 유사하게 기능회복을 할 수 있는 가장 보편적인 시술이다. 때문에 임플란트 시술은 지속적으로 증가하고 발전하여 높은 성공률을 보고하고 있다[1]. 그러나 최근 임플란트주위염을 원인으로 28~56%의 실패율을 나타내고 있으므로 임플란트 실패와 합병증에 대해서도 주목하고 있다[2].

임플란트주위염은 인접한 자연치아 치주염보다 빠르고 깊게 진행되는 양상을 나타내는데[3], 이유로는 자연치와 생물학적 구조가 다르고, 주위조직에 혈관 분포량이 적기 때문이다[3]. 이러한 임플란트주위염도 치주염과 마찬가지로 미생물로부터 시작되므로 군집하여 성장하는 미생물 특징과 상호연관성[4,5]에 주목해야 한다. Socransky 등[5]은 군생태학(community ecology)의 서열화방법(community ordination)으로 치은연하 치면세균막 미생물들을 5가지 군집으로 분류하였다. 이 방법은 종과 장소, 환경변수 사이의 관계를 규명하여 장소와 환경 변화에 따른 종 분포의 변화양상을 예측하는 것으로 미생물의 특징과 상호연관성, 염색반응, 집락형태 및 색소생성, 임상적 지표 등을 기준으로 한다. 미생물 군집 중 yellow complex와 purple complex는 건강한 치주상태와 관련이 높고, green complex는 치주염 초기에 집락을 이루는 군집이다. Orange complex는 초기 미생물 군집을 후기 군집으로 이어가는 중간 연결고리 역할을 한다. Red complex는 병원성이 강하고 질환 후

기에 군집하며, 탐침 시 치주낭이 깊고 출혈과 같은 치주질환 지표에 강한 상관관계를 가진 미생물 군집이다. *A. actinomycetemcomitans*는 균주의 혈청형 b가 달라 군집으로 분류하지 않으나[5] 국소 부위에 공격적이고 진행 속도가 빠른 급진성 치주질환 병원균[6]으로 주요하게 관찰해야 한다. 이러한 미생물의 특성을 고려하여 미생물의 조성 과 양, 상호작용에 대해 파악하는 것은 임플란트주위염을 이해하고 관리하는데 중요한 역할을 할 수 있다.

임플란트주위염은 다양한 전신질환, 특히 당뇨와의 상호연관성이 입증되고 있다[7-10]. 당뇨환자의 신진대사 조절능력이 낮아질 경우 감염 가능성이 증가하여 임플란트 손실위험이 높아지는데[7], 실패 위험률은 일반인에 비해 2.73배 높다[10]. 또한 치주낭 내 특정 병원성 미생물은 심혈관질환의 위험인자로[11,12] 혈류로 유입되어 전신적인 염증을 유발하고[13], 고혈압 유병율과도 관련이 높아[14] 이들의 양방향성에 대한 관심이 높아지고 있다. 임플란트주위염은 치주염 병력과도 연관성이 높아 만성치주염 환자는 물론 과거 치주염 병력이 있는 환자에게도 높은 발병율을 나타낸다[15]. 흡연[16]과 음주[16,17], 부적절한 치면세균막 조절[18,19] 등 건강행위도 주요한 위험요인으로 임플란트주위염을 악화시킬 수 있다.

따라서 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물 조성 과 양을 정확히 분석하고 대상자의 건강상태 및 건강행위와 연관성을 파악하는 것은 매우 중요하다. 그러나 기존의 임플란트주위염 원인균을 밝히기 위한 방법들은 배양기반 미생물 검사방법에서 검체 채취의 어려움, 낮은 민감도와 특이도, 교차반응의 문제 등의 한계가 있었다[20]. 분자생물학적 기술을 적용한 중합효소연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction)은 미생물 출현율을 확인할 수 있으나 정량적인 분석이 불가능하였다[21]. 그러나 최근 특이도와 민감도가 높은 다중 실시간 중합효소 연쇄반응기법(Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction)에 의한 분석기술 개발로 구강 내 미생물의 출현율 분석과 정량적 측정이 가능해졌다[22].

따라서 본 연구는 다중 실시간 중합효소연쇄반응(Multiplex Real-time PCR)을 사용하여 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물의 조성 과 출현율을 상대정량하여 자연치아에 형성된 치주낭에서와 차이를 분석하고, 건강상태와의 연관성과 건강행위의 영향을 규명하여 임플란트주위염 예방 과 관리에 기여하고자 한다.

연구방법

본 연구는 00대학교 00병원 임상연구심의위원회에서 승인(IRB NO. 2020AS0073)을 받았다. 구치부에 임플란트 보철물을 식립한 후 1년 이상의 기능부하 기간이 경과하였고, 임플란트주위염으로 2020년도 3월 17일부터 8월 31일까지 고려대학교 안산병원 치과에 내원한 만 20세 이상의 성인을 대상으로 하였다. 임플란트주위염은 Froum과 Rosen[23]이 제시한 방법으로 탐침 시 출혈이나 화농이 동반되며, 치주낭 깊이가 4 mm 이상인 경우로 한정하였다. 이 중 최근 3개월 이내 치주치료를 받은 경험이 있거나 최근 3개월 이내 항생제를 복용한 자는 제외하였다. 연구목적 과 방법, 실험에 대해 자세한 설명을 듣고 자발적으로 동의서에 서명한 참여자 51명의 자료를 분석하였다.

1. 설문조사

참여자는 당뇨와 고혈압 유무에 대한 건강상태와 흡연 및 음주와 스케일링 경험에 대한 건강행위에 대해 자기기입식으로 응답하였다.

2. 치주낭 검사

치주낭 검사는 치석부착 정도와 치은염 및 치주낭 형성여부를 종합적으로 평가하는 지역사회치주지수(Community Periodontal Index; CPI)를 이용하였다[24]. 상·하악을 6분악으로 구분한 후 표준검사치아인 상·하악 좌·우측 1·2대구치, 우측 중절치, 좌측 중절치의 치은열 구 깊이를 연구자가 직접 측정하였다. 표준치아가 1개도 없으면 제3대구치를 제외한 해당 분악의 모든 치아를 측정하여 열구 깊이가 4 mm 이상일 때 치주낭으로 평가하여 치주낭보유분악수는 최소 1개에서 최대 6개로 산출하였다. 측정 도구는 tip의 끝부분에 직경 0.5 mm의 볼이 형성되었고, 3.5~5.5 mm 부위에 검은 띠가 있어 치주낭을 쉽게 측정할 수 있는 CPI probe를 이용하였다.

3. 치은열구액 채취

채취 참여자는 1시간 전부터 식사 및 음료, 흡연, 칫솔질을 포함한 구강위생용품의 사용을 제한하였다. 임플란트의 치은연상 치태를 제거하고 방습한 후 구치부 임플란트 협측과 설측, 근·원심 col 부위에서 멸균된 근관치료용 paper point (#35번, 04 taper, 다이아덴트, 한국)를 30~40초간 삽입하여 각 임플란트에서 4개의 표본을 획득하였다. 치은열구액을 채취한 paper point는 50 mL conical tube에 즉시 넣어 4°C 이하로 냉장 보관하여 구강 미생물 관련 유전자검사기관(주)티비헬스케어에 의뢰하였다.

4. 병원성 미생물 DNA 추출과 정량분석방법

병원성 미생물 genomic DNA (gDNA)의 추출은 컬럼 방식의 Exgene Cell SV DNA 분리 Kit (Exgene Cell SV, GeneAll Biotech., Seoul, Korea)를 이용하여 제조업체 지시에 따라 추출하였다. 정제된 gDNA는 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, U.S.A)을 사용하여 260 nm에서 정량하고 -20°C에 보존하면서 본 실험에 사용하였다. 검체로부터 분리된 gDNA와 클론 표준물질들의 주형에 분석 대상 미생물의 특이적인 유전자 DNA 염기서열 정보를 바탕으로 제작된 정, 역방향 Primer와 상호 간섭을 고려하여 파장이 겹치지 않는 probe 3종을 선택하였다. 이후 분석대상 균주를 3, 4종씩 묶어서 3종류의 pannel로 제작하였고<Table 1>, CFX96-IVD real - time PCR detection system (Bio-Rad Inc., U.S.A)으로 분석하였다. 조건은 95°C 5분 1회, 95°C 30초, 60°C 40초, 72°C 30초 간 반응을 41회 반복하여 각 검체의 전체 gDNA 정해진 양을 기준으로 균주를 정량 분석하였다. 분석결과는 sample 당 2회 실시한 평균값으로 산정된 수치를 간략하게 표현하여 차이의 비교가 용이하도록 지수로 전환하여 제시하였다.

Table 1. Used strains in this study

Pannel	Scientific name	Target strain	Popular
A	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	KCCM 12227	ATCC 29522
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KCTC 5352	ATCC 33277
	<i>Tannerella forsythia</i>	KCTC 5666	ATCC 43037
	<i>Treponema denticola</i>	KCTC 15104	ATCC 35405
B	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	KCTC 2640	ATCC 25586
	<i>Prevotella nigrescens</i>	KCTC 15081	ATCC 33563
	<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC 5692	ATCC 25611
C	<i>Eubacterium nodatum</i>	KCTC 15015	ATCC 33099
	<i>Parvimonas micra</i>	KCOM 1535	ATCC 33270
	<i>Campylobacter rectus</i>	KCTC 5636	ATCC 33238
	<i>Eikenella corrodens</i>	KCTC 15198	ATCC 23834

표준곡선(Standard curve)은 한국생명공학연구원 미생물자원센터(KCTC, Korea)와 한국미생물 보존센터(KCCM, Korea), 한국구강미생물 자원은행(KCOM, Korea)에서 분양받은 표준균주의 gDNA를 사용하여 작성하였다. Real-time PCR 분석 전에 이미 제시된 DNA 정보의 값을 이용하여 분석 후 결과 값이 분석 전 입력 값에 대비하여 표준곡선이 그려진다<Fig. 1,2>.

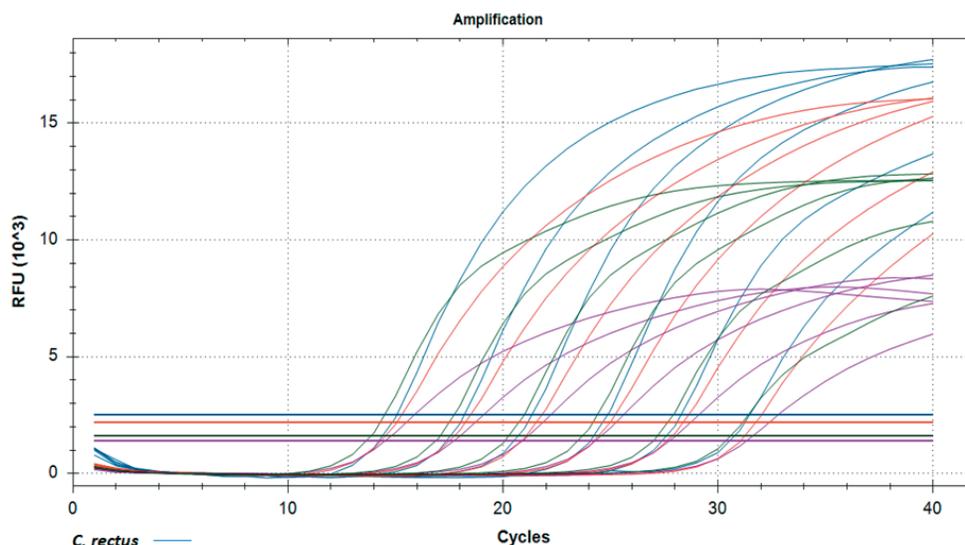


Fig. 1. Amplification of profiles for *C.rectus*-specific PCR products

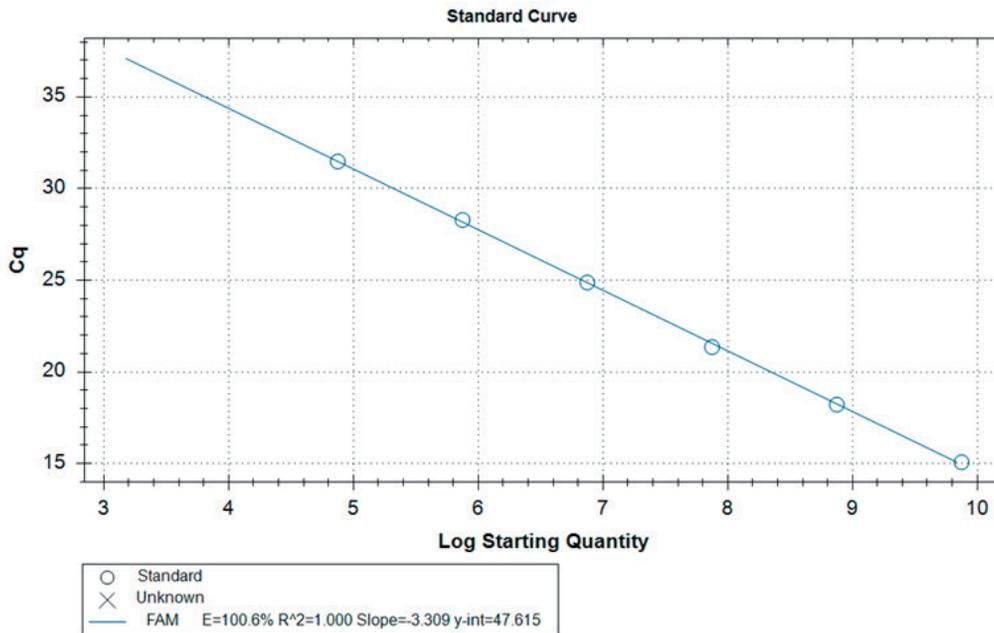


Fig. 2. Standard curve of *C. rectus*

5. 자료분석

수집된 자료는 IBM SPSS(IBM SPSS 21.0 for windows, SPSS INC, Chicago, II, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 병원성 미생물의 출현율은 빈도분석을 시행하였다. 당뇨 및 고혈압 여부와 치주낭보유분악수, 흡연, 음주, 스케일링 여부에 따른 임플란트주위염 관련 병원성 미생물 분포의 차이는 Mann-Whitney test를 실시하였다. 병원성 미생물 간의 상관관계는 Pearson’s correlation으로 분석하였고, 통계적 유의성 판정은 0.05를 고려하였다.

연구결과

1. 연구 참여자의 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물 출현율과 양

병원성 미생물 *A. actinomycetemcomitans* 출현율은 참여자의 9.8%였고, 평균량은 4.25E+04였다. Red complex의 *P. gingivalis* 출현율은 88.2%였고, 평균량은 2.76E+07였으며, *T. denticola*는 58.8%, 1.91E+06였으며, *T. forsythia*는 54.9%, 7.22E+06이었다. Orange complex의 *F. nucleatum* 출현율은 100%, 평균량은 1.29E+08였다. *P. micra*는 96.0%, 5.10E+06, *P. nigrescens*는 86.2%, 1.43E+07, *C. rectus*는 80.3%, 1.76E+06, *E. nodatum*은 64.7%, 4.22E+06, *P. intermedia*는 62.7%, 1.50E+07였다. Green complex의 *E. corrodens* 출현율은 98.0%, 평균량은 4.99E+06이었다<Fig. 3, Table 2>.

Table 2. Average amount of each pathogenic microorganism in implant periodontal pockets

No	A.a	Red complex			Orange complex					Green complex	
		P.g	T.f	T.d	F.n	P.n	P.i	P.m	E.n	C.r	E.c
ACN	4.25E + 04	2.76E + 07	7.22E + 06	1.91E + 06	1.29E + 08	1.43E + 07	1.50E + 07	5.10E + 06	4.22E + 06	1.76E + 06	4.99E + 06

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, P.g: *Porphyromonas gingivalis*, T.f: *Tannerella forsythia*, T.d: *Treponema denticola*, F.n: *Fusobacterium nucleatum*, P.n: *Prevotella nigrescens*, P.i: *Prevotella intermedia*, P.m: *Parvimonas micra*, E.n: *Eubacterium nodatum*, C.r: *Campylobacter rectus*, E.c: *Eikenella corrodens*

ACN: Average copy number

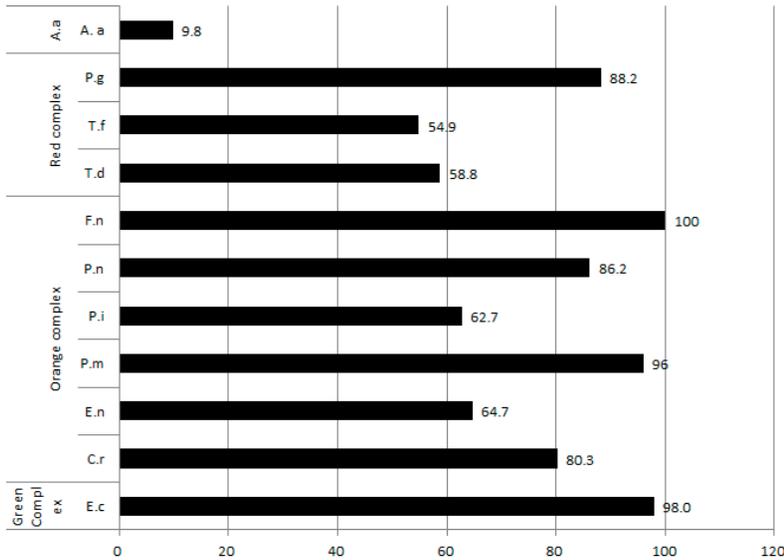


Fig. 3. The prevalence of pathogenic microorganisms in participants (%)

2. 치주낭 내 병원성 미생물 간의 상관관계

Red complex중 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*는 정적 상관관계를 나타냈다($r=0.567, p<0.01$). 강력한 상관관계를 나타낸 균주는 orange complex의 *C. rectus*와 *E. nodatum*이었고, *C. rectus*는 red complex의 *P. gingivalis* ($r=0.385, p<0.01$), *T. forsythia* ($r=0.492, p<0.01$), *T. denticola* ($r=0.367, p<0.01$)와 상관성을 보였으며, *P. intermedia* ($r=0.329, p<0.01$)와 *E. nodatum* ($r=0.519, p<0.01$)이 상관성이 나타났다. *E. nodatum*은 red complex의 *P. gingivalis* ($r=0.493, p<0.01$)와 *T. forsythia* ($r=0.628, p<0.01$), orange complex의 *P. intermedia*도 상관성이 높았다($r=0.409, p<0.01$)<Table 3>.

Table 3. Pearson's correlation between pathogenic microorganisms in periodontal pockets

Bacteria		A.a	Red complex			Orange complex					Green complex	
			P.g	T.f	T.d	F.n	P.n	P.i	P.m	E.n	C.r	E.c
A.a		1.000										
Red complex	P.g	-0.135 (0.344)	1.000									
	T.f	-0.064 (0.654)	0.567 (< 0.01)	1.000								
	T.d	-0.051 (0.72)	0.098 (0.495)	-0.022 (0.880)	1.000							
Orange complex	F.n	-0.114 (0.426)	0.331 (< 0.05)	0.128 (0.371)	-0.019 (0.892)	1.000						
	P.n	-0.123 (0.389)	0.130 (0.364)	-0.135 (0.346)	0.089 (0.535)	0.137 (0.336)	1.000					
	P.i	-0.118 (0.412)	0.264 (0.061)	0.208 (0.143)	-0.007 (0.961)	0.463 (< 0.01)	0.012 (0.933)	1.000				
	P.m	-0.111 (0.437)	0.112 (0.432)	-0.079 (0.583)	-0.030 (0.833)	0.616 (< 0.01)	0.131 (0.358)	0.290 (< 0.05)	1.000			
	E.n	-0.022 (0.88)	0.493 (< 0.01)	0.628 (< 0.01)	0.064 (0.654)	0.092 (0.521)	-0.040 (0.778)	0.409 (< 0.01)	0.065 (0.648)	1.000		
	C.r	-0.025 (0.863)	0.385 (< 0.01)	0.492 (< 0.01)	0.367 (< 0.01)	0.061 (0.673)	0.087 (0.544)	0.329 (< 0.01)	-0.168 (0.238)	0.519 (< 0.01)	1.000	
Green complex	E.c	-0.134 (0.347)	-0.131 (0.359)	-0.170 (0.234)	0.053 (0.711)	-0.020 (0.887)	0.142 (0.319)	0.033 (0.821)	0.216 (0.127)	-0.075 (0.601)	-0.143 (0.318)	1.000

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, P.g: *Porphyromonas gingivalis*, T.f: *Tannerella forsythia*, T.d: *Treponema denticola*, F.n: *Fusobacterium nucleatum*, P.n: *Prevotella nigrescens*, P.i: *Prevotella intermedia*, P.m: *Parvimonas micra*, E.n: *Eubacterium nodatum*, C.r: *Campylobacter rectus*, E.c: *Eikenella corrodens*

3. 당뇨와 고혈압, 치주낭보유분악 수에 따른 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물 양

당뇨군에서 red complex 총량은 6.34E+07로 비당뇨군의 2.85E+07보다 유의하게 많았다($p<0.05$). 이중 *P. gingivalis*도 당뇨군이 4.74E+07로 비당뇨군(2.15E+07)보다 많았다($p<0.05$). Orange complex의 *P. nigrescens*는 당뇨군(2.33E+07)과 고혈압군(2.33E+07)이 비당뇨군(1.15E+07)과 비고혈압군(8.50E+06)보다 많았다($p<0.05$). 치주낭보유분악수를 중위수 4개 기준으로 나누어 분석한 나눈 결과 미생물 총량은 치주낭 4개 이상 군이 2.45E+08로 4개 미만 군의 1.58E+08보다 유의하게 많았다($p<0.05$). Red complex 총량은 4개 이상 군에서 4.78E+07로 4개 미만 군의 1.95E+07보다 많았다($p<0.05$). 이중 *P. gingivalis*와 *T. denticola*도 4개 이상 군(3.66E+07, 3.03E+06)이 4개 미만 군(1.36E+07, 1.59E+05)보다 유의하게 많았다($p<0.05$). Orange complex의 *P. intermedia*와 *E. nodatum*, *C. rectus*가 4개 이상 군에서 1.99E+07, 5.59E+06, 2.02E+06개로 4개 미만 군(7.33E+06, 2.09E+06, 1.35E+06)보다 유의하게 많았다($p<0.05$)<Table 4>.

4. 건강 행위(흡연, 음주, 치주관리)에 따른 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물 양

흡연군의 병원성 미생물 총량은 3.11E+08로 비흡연군의 1.92E+08보다 유의하게 많았다($p<0.05$). Orange complex 총량도 흡연군은 2.56E+08로 비흡연군(1.53E+08)보다 많았고, *P. micra*와 green complex의 *E. corrodens*도 흡연군(1.13E+07, 7.85E+06)이 비흡연군(3.94E+06, 4.45E+06)보다 유의하게 많았다($p<0.05$). Red complex의 *T. denticola*는 음주군(3.10E+06)이 비음주군(5.64E+05)보다 많았고, 6개월 이내 스케일링을 한 경우 orange complex의 *C. rectus*가 1.93E+06으로 미시행군의 1.11E+06보다 유의하게 많았다($p<0.05$)<Table 5>.

총괄 및 고안

생태학적으로 동일한 구강환경에서 임플란트와 치아표면의 바이오필름을 형성하는 미생물은 유사한 것으로 보고되었다[25]. 그러나 최근 유전자 염기서열 분석 방법을 통한 임플란트주위염의 미생물 분포 양상을 분석한 결과는 치아의 치주염과는 차이가 있음을 보고하고 있다[20]. 따라서 본 연구는 임플란트주위염에 이환된 치주낭 내 병원성 미생물의 종류를 파악하고 상대 정량 분석하여 이에 영향을 미치는 건강상태와 건강행위 요인의 특성을 규명하는데 목적을 두었다. 국소부위 급성치주염 유발 균주인 *A. actinomycetemcomitans*는 임플란트 치주낭에서 출현율이 매우 높은 것으로 보고되고 있다[6]. 그러나 본 연구에서는 참여자의 9.8%에서만 확인되어 한국인을 대상으로 한 자연치아 치주낭의 13.3%의 출현율[26]과 유사하였다. 구강 내 미생물 구성은 인종과 지리적 요건에 따라 차이가 있으며[27], 특히 치주낭 미생물 분포와 조성은 연령과 성별, 치주낭 깊이를 조정하더라도 인종에 따라 다양한 차이가 존재한다[28]. 따라서 한국인 치주낭에는 *A. actinomycetemcomitans* 빈도가 낮을 가능성이 높다. Red complex는 병원성이 강하고 질환 후기에 군집하여[5], 치주낭을 형성하며 치주염을 심화하는데 주된 역할을 한다[29]. *P. gingivalis*는 절대 혐기성 그람음성균으로 독성이 높아 치주염 유발에 직접적 영향을 미치는데[30], 특히 심폐한 임플란트 주위 열구에서 높은 비율로 검출된다[31]. 본 연구에서도 가장 높은 출현율인 88.2%였고, 평균량은 2.76E+07이었다. 이러한 병원성 미생물은 역시 이상으로 존재할 때 질병이 심화되므로[6] 일정 수 이하로 줄이려는 건강행위는 매우 중요하다. 4 mm 이상 치주낭에서는 *P. gingivalis* 외에도 *T. denticola* 균주가 우세하다[32]고 했으나 본 연구에서는 *T. denticola*와 *T. forsythia* 출현율은 58.8%와 54.9%로 유사하였다. Sumida 등[33]도 *P. gingivalis*가 80.0%에 비해 *T. denticola*는 40.0%였고, 오히려 *T. forsythensis*가 60.0%였다고 하여 임플란트주위염 유발에 대한 영향력이 가장 높은 균주는 *P. gingivalis*임을 예측할 수 있었다. 성인에서 발생하는 치주염의 주요 병인으로 초기 군집 미생물과 후기 군집 미생물로 이어지는 중간 연결고리 역할을 하는 orange complex[5] 중 *F. nucleatum*는 출현율 100%로 모든 참여자의 치주낭에 존재하였고, 평균 1.29E+08을 나타냈다. *P. micra* 역시 96.0% 평균 5.10E+06으로 상당수의 참여자에서 출현하였다. 임플란트 환자의 타액에서 문[34]은 *F. nucleatum*과 *P. micra*의 100% 출현율을, 김[35]은 *F. nucleatum* 100%, *P. micra* 99.4%를 보고하여 임플란트주위염에 광범위하게 분포하는 균주임을 확인했다. 이외에도 *P. nigrescens*와 *C. rectus*도 각각 86.2%와 80.3%로 높은 출현율을 나타내 주요하게 관찰해야 하는 균주임을 알 수 있다. 자연치를 잘 관리하는 경우에서도 임플란트의 74%는 치면세균막이 발견되어[19] 임플란트의 구조적 특징이 치면세균막 제거를 어렵게 함을 알 수 있다.

Table 4. Amount of pathogenic microorganisms in implant periodontal pocket according to diabetes, hypertension, number of periodontal pocket

Bacteria	Diabetes			Hypertension			Number of periodontal pocket				
	Presence (N = 12)		P*	Presence (N = 20)		P*	Less than 4 (N = 20)		P*		
	Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD			
A.a	-	-	0.245	1.01E+05	3.23E+05	0.116	-	1.54E+05	4.30E+04	2.35E+05	0.442
Red complex	4.74E+07	4.20E+07	0.039	3.18E+07	3.87E+07	0.356	1.36E+07	2.19E+07	3.66E+07	3.47E+07	0.001
T.f	1.03E+07	1.43E+07	0.240	6.26E+06	1.11E+07	0.291	5.75E+06	1.30E+07	8.17E+06	1.16E+07	0.096
T.d	5.73E+06	1.47E+07	0.458	3.56E+06	1.15E+07	0.473	1.59E+06	3.12E+05	3.03E+06	9.61E+06	0.008
Sub total	6.34E+07	5.49E+07	0.049	4.16E+07	4.95E+07	0.404	1.95E+07	3.14E+07	4.78E+07	4.38E+07	0.001
Orange complex	1.48E+08	1.09E+08	0.258	1.49E+08	1.18E+08	0.299	1.06E+08	7.92E+07	1.44E+08	1.00E+08	0.122
P.n	2.33E+07	2.74E+07	0.049	2.33E+07	2.73E+07	0.004	1.22E+07	1.46E+07	1.56E+07	2.40E+07	0.443
P.i	1.71E+07	2.29E+07	0.238	1.59E+07	2.89E+07	0.489	7.33E+06	2.06E+07	1.99E+07	2.88E+07	0.002
P.m	5.14E+06	5.19E+06	0.489	6.73E+06	7.59E+06	0.188	3.51E+06	4.59E+06	6.12E+06	6.48E+06	0.059
E.n	4.72E+06	8.71E+06	0.356	3.94E+06	6.90E+06	0.360	2.09E+06	5.52E+06	5.59E+06	7.34E+06	0.008
C.r	2.38E+06	3.33E+06	0.496	1.93E+06	2.64E+06	0.428	1.35E+06	2.19E+06	2.02E+06	2.39E+06	0.035
Sub total	2.01E+08	1.33E+08	0.193	2.01E+08	1.49E+08	0.139	1.32E+08	9.50E+07	1.93E+08	1.27E+08	0.063
Green complex	6.22E+06	6.77E+06	0.142	5.42E+06	7.28E+06	0.400	6.40E+06	1.02E+07	4.07E+06	5.46E+06	0.325
Sum of 11 bacteria	2.70E+08	1.64E+08	0.051	2.48E+08	1.73E+08	0.127	1.58E+08	1.13E+08	2.45E+08	1.44E+08	0.016

by the Mann-Whitney non-parametric test

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, P.g: *Porphyromonas gingivalis*, T.f: *Tannerella forsythia*, T.d: *Treponema denticola*, F.n: *Fusobacterium nucleatum*, P.n: *Prevotella nigrescens*, P.i: *Prevotella intermedia*, P.m: *Parvimonas micra*, E.n: *Eubacterium nodatum*, C.r: *Campylobacter rectus*, E.c: *Eikenella corrodens*

Table 5. Amount of pathogenic microorganisms in the periodontal pocket of the implant according to smoking, drinking, and scaling

Bacteria	Smoking			Alcohol drinking			Scaling				
	Smoke (N = 8)		P*	Alcoholics (N = 27)		P*	Scaled (N = 40)		P*		
	Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD			
A.a	2.40E+03	6.79E+03	0.506	2.60E+04	1.31E+05	0.322	5.42E+04	2.31E+05	-	0.280	
Red complex	3.72E+07	3.44E+07	0.131	2.97E+07	3.45E+07	0.267	2.95E+07	3.37E+07	2.04E+07	2.58E+07	0.158
T.f	2.59E+06	1.79E+07	0.109	5.95E+06	9.47E+06	0.434	8.14E+06	1.29E+07	3.88E+06	8.49E+06	0.095
T.d	7.46E+06	1.79E+07	0.067	3.10E+06	1.02E+07	0.080	2.39E+06	8.51E+06	1.43E+05	3.39E+05	0.072
Sub total	4.73E+07	3.87E+07	0.106	3.87E+07	4.12E+07	0.209	4.01E+07	4.34E+07	2.44E+07	3.24E+07	0.089
Orange complex	1.84E+08	1.24E+08	0.060	1.31E+08	8.21E+07	0.349	1.27E+08	9.69E+07	1.35E+08	8.39E+07	0.304
P.n	2.24E+07	2.94E+07	0.073	1.72E+07	2.10E+07	0.055	1.31E+07	1.80E+07	1.85E+07	2.95E+07	0.406
P.i	3.06E+07	4.89E+07	0.150	1.67E+07	2.64E+07	0.130	1.72E+07	2.87E+07	6.76E+06	1.31E+07	0.144
P.m	1.13E+07	8.84E+06	0.003	5.33E+06	5.10E+06	0.101	4.23E+06	4.86E+06	8.25E+06	8.26E+06	0.091
E.n	5.08E+06	6.53E+06	0.258	5.00E+06	6.35E+06	0.059	4.21E+06	7.23E+06	4.23E+06	5.53E+06	0.405
C.r	2.17E+06	2.52E+06	0.424	1.61E+06	1.86E+06	0.343	1.93E+06	2.31E+06	1.11E+06	2.31E+06	0.027
Sub total	2.56E+08	1.64E+08	0.026	1.77E+08	1.03E+08	0.224	1.68E+08	1.22E+08	1.74E+08	1.10E+08	0.380
Green complex	7.85E+06	7.28E+06	0.026	5.38E+06	6.36E+06	0.143	4.83E+06	7.69E+06	5.55E+06	7.96E+06	0.476
Sum of 11 bacteria	3.11E+08	1.57E+08	0.012	4.58E+08	1.29E+08	0.224	2.13E+08	1.41E+08	2.04E+08	1.32E+08	0.486

by the Mann-Whitney non-parametric test

A.a: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, P.g: *Porphyromonas gingivalis*, T.f: *Tannerella forsythia*, T.d: *Treponema denticola*, F.n: *Fusobacterium nucleatum*, P.n: *Prevotella nigrescens*, P.i: *Prevotella intermedia*, P.m: *Parvimonas micra*, E.n: *Eubacterium nodatum*, C.r: *Campylobacter rectus*, E.c: *Eikenella corrodens*

이러한 병원성 미생물들은 상호연관성이 높고, green complex보다 red complex 세균으로 갈수록 더욱 긴밀해[5]. 특히 red complex는 미생물의 상호 응집력이 강해지고 특정 미생물 종이 다른 종에 필요한 성장 인자를 생성할 수 있으며, *P. gingivalis*와 *T. forsythensis* 균주는 상호연관성이 매우 높다[5]. 본 연구의 임플란트 치주낭에서도 *P. gingivalis*와 *T. forsythensis* 두 균주는 유의한 정적 상관관계로 서로의 성장에 영향이 있었다. 그러나 무엇보다 영향력이 높은 균주는 orange complex 중 *C. rectus*와 *E. nodatum*임을 알 수 있었다. 이 균주들은 동일 군내에서 상호 강력한 연관성을 나타냈고, *P. intermedia*와도 연관성이 높았다. 뿐만 아니라 *C. rectus*는 red complex의 *P. gingivalis*와 *T. forsythia* 및 *T. denticola* 세 가지 균 모두와 강한 상관성을 나타냈고, *E. nodatum*는 *P. gingivalis*와 *T. forsythia*와도 상관성이 높았다. 유사한 결과를 얻은 Haffajee 등[37]은 *E. nodatum*을 red complex에 포함하여 제시하기도 하였다. 이러한 결과는 *C. rectus*와 *E. nodatum* 두 균주가 red complex와 orange complex의 연결고리로서의 분명한 역할이 있음을 유추하게 한다. 또한, 이러한 특정 세균 간 상호연관성은 치료를 통해 특정 세균을 제거할 경우 군집 형성을 방해하거나 complex 군집 간의 연결고리를 차단하여 치주염 진행을 효율적으로 예방할 수 있음을 시사하는 것이다.

임플란트주위염과 당뇨와의 상호연관성은 많은 연구에서 검증되고 있다. 당뇨환자의 신진대사 조절능력이 낮아지면 감염 가능성이 증가하여 임플란트 손실위험으로 이어질 수 있는데[7], 실제로 당뇨 환자는 *P. gingivalis* 출현율이 특히 높아 특정 병원성 미생물과의 관련성이 제시되고 있다[8]. 1형 당뇨 환자에서는 *A. actinomycetemcomitans*와 red complex의 *P. gingivalis*, orange complex의 *P. intermedia* 출현율이 높았고[9], 일반인에 비해 임플란트 실패 위험률은 2.73배 증가하였다[10]. 본 연구 참여자의 당뇨군 임플란트 치주낭에서도 *P. gingivalis*와 *P. nigrescens*가 당뇨가 없는 군에 비해 유의하게 높은 수치를 나타냈다. 11종 병원성 미생물의 총량 또한 높아 당뇨가 임플란트주위염에 매우 취약한 질병임을 알 수 있다. Al-Emadi 등[14]은 심한 치주질환이 당뇨 외에도 고혈압 환자에서 증가하였다고 하였고, Moy 등[10]은 임플란트주위염과 고혈압은 연관성이 없다고 하였다. 그러나 *P. gingivalis* 또는 *P. nigrescens*가 존재할 때 심혈관계질환의 합병증 위험성이 높아지고[11], *P. gingivalis*는 대동맥 평활근으로의 침입이 가능하므로 동맥경화에 기여할 수 있다[12]. 본 연구에서 고혈압 군은 orange complex의 *P. nigrescens* 출현율이 유의하게 높아 관련된 연구의 체계적 검토와 심도 있는 연구가 요구되었다. 임플란트 치주낭의 병원성 미생물은 인접한 자연치아 치주낭 깊이와 비례하여 증가하며[15], 치주치료가 이루어졌더라도 과거 치주염 병력이나 치아 상실의 원인이 치주염과 연관된 경우 임플란트주위염 위험도가 높아졌다[15]. 특히 *P. gingivalis*는 인접한 자연치아와 임플란트 치주낭에서 상호 직접 이주함이 증명되었다[33]. 따라서 4mm 이상의 치주낭을 형성한 분악수를 산정하여 중위수 4로 구분한 결과, 치주낭을 4개 이상 보유한 군에서 11가지 병원성 미생물의 총량과 red complex 미생물 총수가 유의하게 많음을 확인하였다. 또한 4개 이상 치주낭보유군은 red complex의 *P. gingivalis*와 *T. denticola*와 orange complex의 *P. intermedia*와 *E. nodatum*, *C. rectus*가 4개 미만 치주낭보유군보다 유의하게 많았다. 구강 내 인접한 임플란트와 자연치아의 치주낭에서 각각 미생물을 채취하여 검사했을 때 치주질환이 진행됨에 따라 병원성 미생물 농도와 균종의 다양성이 모두 증가했고, 동일 미생물의 검출 또는 미검출 일치율은 81.6%를 나타냈다[15]. 따라서 임플란트 치료 전후 자연치아와 임플란트의 통합적인 치주관리가 전반적으로 이루어져야 할 필요성이 있을 것으로 판단된다.

임플란트주위염과 골소실에 흡연은 영향력이 높은 요인으로 보고되고 있다[17,18]. Heitz-Mayfield[18]는 흡연자에서 구강 내 미생물이 해로운 방향으로 변하며 특히 *P. gingivalis* 출현율이 높아지고, 중증도 골 소실과 관련성이 높다고 하였다. Galindo-Moreno 등[17]도 임플란트 변연골 흡수의 가장 결정적인 요인이 흡연이라고 하였다. 본 연구에서도 임플란트 치주낭 내 존재하는 11종 병원성 미생물의 총량과 orange complex 총량, 특히 *P. micra*와 *E. corrodens*가 흡연군에서 유의하게 많았다. 흡연자와 비흡연자 간 치주낭 내 미생물 군집에 뚜렷한 차이를 나타내 임플란트주위염 예방에 금연은 반드시 병행되어야 할 중요한 건강행위로 사료된다. 음주 역시 임플란트주위염을 유발하고 치조골 소실로 이어질 수 있는데[17], 이는 음주자의 부적절한 영양섭취가 구강건강에 부정적 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 음주여부에 따른 임플란트 병원성 미생물의 차이를 살펴본 결과 red complex의 *T. denticola*가 음주군에서 유의하게 높았고, 문[35]도 음주자에서 *T. forsythia*가 높다고 하였다. 음주 후 구강관리의 소홀이 병원성 미생물 군집으로 이어질 가능성을 배제할 수 없으나, 임플란트주위염을 유발하는 미생물에 대한 직접적인 영향이 있는지에 대한 후속연구 필요성을 시사한다.

임플란트의 생존율에는 주기적인 검진과 치주관리, 치면세균막 조절능력, 적절한 구강위생용품 사용이 중요하다[38]. 스케일링 시행 군에서 *A. actinomycetemcomitans*가 유의하게 낮았다고 하였으나[35] 본 연구에서는 6개월 이내 스케일링 시행 군에서 orange complex의 *C. rectus*가 높았다. 본 연구에서는 예방 또는 치료목적에 대한 구별을 하지 않았고, 구강건강상태에 따라 스케일링 시행의 목적이 다를 수 있기 때문에 추후 연구에서 검토할 필요성이 있다. 하지만 불량한 구강환경은 부적절한 치면세균막 조절과 관련이 높고[19], 임플란트주위염의 위험 인자가 된다[18]. 따라서 임플란트주위염을 예방하고 생존율을 높이기 위해서는 치면세균막 조절능력을 향상시켜야 하며, 전문가치면세균막 관리와 치주치료의 요구도 파악이 짧은 주기로 지속해야 할 필요가 있다고 사료된다.

본 연구는 제한된 표본으로 일반화에 신중을 기할 필요가 있다. 그러나 여러 부위에서 유래한 미생물이 희석되지 않도록 임플란트주위염 해당 병소로부터 채취한 치은열구액을 이용했고, 미량의 DNA만으로도 확인할 수 있는 PCR기법으로 균주와 상대적인 양을 측정했다는 점에서 본 연구의 의미가 있다. 추후 임플란트 치주낭에서 발현되는 특종 균주의 특성을 파악하여 예방과 치료의 접근과 효과성을 입증하는 연구가 이루어지기를 제언한다.

결론

다중 실시간 중합효소연쇄반응(Multiplex Real-time PCR)을 사용하여 임플란트 치주낭 내 병원성 미생물의 조성과 출현율을 상대정량하여 자연치아 주위염과의 차이를 분석하고, 건강상태와의 연관성과 건강행위의 영향을 규명한 결과는 다음과 같다.

1. 임플란트 치주낭에서는 *F. nucleatum*(100%), *E. corrodens*(98.0%), *P. micra*(96.0%), green complex의 red complex의 *P. gingivalis*(88.2%) 출현율이 매우 높았다.

2. Orange complex의 *C. rectus*와 *E. nodatum*는 상호 연관성이 매우 높은 균주($p < 0.01$)였으며, 특히 red complex의 균주들과 정적상관성이 높았다.

3. 당뇨군에서 red complex 총량과 *P. gingivalis*, orange complex의 *P. nigrescens*가 많았고($p < 0.05$), 고혈압군에서는 orange complex의 *P. nigrescens*가 많았으며($p < 0.05$), 치주낭보유분악수 4개 이상 군은 red complex 총량과 *P. gingivalis*, *T. denticola*, orange complex의 *P. intermedia*, *E. nodatum*, *C. rectus*가 유의하게 많았다($p < 0.05$).

4. 흡연군은 orange complex 총량과 *P. micra*, *E. corrodens*($p < 0.05$), 음주군은 red complex의 *T. denticola*($p < 0.05$), 스케일링 군에서는 orange complex의 *C. rectus*가 유의하게 많았다($p < 0.05$).

이상의 결과에서 임플란트 치주낭에서 검출된 대표적 병원성 미생물은 치아 치주낭과 유사하였다. 그러나 미생물 조성과 양에는 차이가 있었으며, 당뇨 및 고혈압, 치주낭보유분악수 등 신체건강상태와 흡연 및 음주, 치주관리 등 건강행위에 영향을 받고 있음을 알 수 있었다.

Conflicts of Interest

The authors declared no conflict of interest.

Authorship

Conceptualization: MJ Kim, GS Han; Data collection: MJ Kim, GS Han; Formal analysis: MJ Kim, GS Han; Writing - original draft: MJ Kim, GS Han; Writing - review & editing: MJ Kim, GS Han

References

- Flores-Guillen J, Álvarez - Nova C, Barbieri G, Martín C, Sanz M. Five-year outcomes of a randomized clinical trial comparing bone-level implants with either submerged or transmucosal healing. *J Clin Periodontol* 2018;45(1):125-35. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12832>
- Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35(s8):286-91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x>
- Salvi GE, Aglietta M, Eick S, Sculean A, Lang NP, Ramseier CA. Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Implants Res* 2012;23(2):182-90. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02220.x>
- Heitz Mayfield LJ. Diagnosis and management of peri-implant diseases. *Aust Dent J* 2008;53(51):43-8. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00041.x>
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Stanley CH, Jeffrey LE. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;38(1):72-122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>

7. Nguyen-Hieu T, Borghetti A, Aboudharam G. Peri-implantitis: from diagnosis to therapeutics. J Investig Clin Dent 2012;3(2):79-94. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00116.x>
8. Ebersole JL, Holt SC, Hansard R, Novak MJ. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. J Periodontol 2008;79(4):637-46. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070455>
9. Sastrowijoto SH, Hillemans P, Van Steenberghe TJ, Abraham-Inpijn L, De Graaff J. Periodontal condition and microbiology of healthy and diseased periodontal pockets in type 1 diabetes mellitus patients. J Clin Periodontol 1989;16(5):316-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1989.tb01662.x>
10. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. Int J Oral Maxillofac Implants 2005;20(4):569-77.
11. Yakob M, Söder B, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Söder PÖ. *Prevotella nigrescens* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis. J Periodontol 2011;46(6):749-55. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01398.x>
12. Lee SM, Lee HW, Lee JY. Porphyromonas gingivalis invasion of human aortic smooth muscle cells. Int J Oral Biol 2008;33(4):163-77.
13. Hong JY. Periodontitis and systemic disease. J Kyung Hee Univ Med Cent 2017;32(1):1-8.
14. Al-Emadi A, Bissada N, Farah C, Siegel B, Al-Zaharani M. Systemic diseases among patients with and without alveolar bone loss. Quintessence Int 2006;37(10):761-5.
15. Lee DY, Lee MS, Kwon YH, Park JB, Herr Y, Chung JH. The influence of adjacent tooth to the microbiology of implant sulcus. J Korean Acad Periodontol 2005;35(3):563-75. <https://doi.org/10.5051/jkape.2005.35.3.563>
16. Sousa V, Mardas N, Farias B, Petrie A, Needleman I, Spratt D et al. A systematic review of implant outcomes in treated periodontitis patients. Clin Oral Implants Res 2016;27(7):787-844. <https://doi.org/10.1111/clr.12684>
17. Galindo - Moreno P, Fauri M, Ávila - Ortiz G, Fernández - Barbero JE, Cabrera-León A, Sánchez - Fernández E. Influence of alcohol and tobacco habits on peri - implant marginal bone loss: a prospective study. Clin Oral Implants Res 2005;16(5):579-86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01148.x>
18. Heitz - Mayfield LJ, Lang NP. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis. Periodontol 2000 2010;53(1):167-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00348.x>
19. Serino G, Ström C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. Clin Oral Implants Res 2009;20(2):169-74. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01627.x>
20. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. J Clin Periodontol 2012;39(5):425-33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>
21. Gersdorf H, Meissner A, Pelz K, Krekeler G, Göbel UB. Identification of Bacteroides forsythus in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. J Clin Microbiol 1993;31(4):941-6. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.4.941-946.1993>
22. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. Microbiol Immunol 2001;45(1):39-44. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb01272.x>
23. Froum SJ, Rosen PS. A proposed classification for peri-implantitis. Int J Periodontics Restorative Dent 2012;32(5):533-40.
24. Jang GW, Kang JB. Oral health survey method 2nd ed. Seoul: Gomoonsa; 2008: 45-8, 73.
25. Botero JE, González, AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. J Periodontol 2005;76(9):1490-5. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.9.1490>
26. Yun JH, Park, JE, Kim DI, Lee SI, Choi SH, Cho KS et al. Identification of putative periodontal pathogens in Korean chronic periodontitis patients. J Korean Acad Periodontol 2008;38(2):143-52. <https://doi.org/10.5051/jkape.2008.38.2.143>
27. Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol 2005;32(8):860-6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00777.x>
28. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral Microbiol Immunol 2008;23(3):196-205. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>
29. Da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol 2011;56(9):899-906. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.009>
30. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. Periodontol 2000 2004;36(1):14-26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2004.03671.x>
31. Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. Int J Oral Maxillofac Implants 1990;5(1):31-8.

32. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontal Res* 1995;30(5):332-41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb01284.x>.
33. Sumida S, Ishihara K, Kishi M, Okuda K. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(5):696-702.
34. Moon KH. The influence on the recognition for periodontal care to oral micro-organism changes in dental implant patients[doctoral thesis]. Cheonan: Univ. of Dankook, 2015.
35. Kim JH, Lee DI, Im SU, Jeon ES, Song KB, Choi YH. Oral health condition according to distribution of periodontopathic bacterial complex. *J Korean Acad Oral Health* 2020;44(1):41-7. <https://doi.org/10.11149/jkaoh.2020.44.1.41>
36. Gmür R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontal Res* 1989;24(2):113-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1989.tb00865.x>
37. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004;31(11):996-1002. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00597.x>
38. Park KH, Han GS. The effects of professional tooth cleaning and plaque control instruction on reduction of peri-implantitis. *J Den Hyg Sci* 2012;12(2):163-70.