

성인형 치주염 환자의
타액 및 치은연하치태에서
*Helicobacter pylori*의 발현양상

The mode of detection of *Helicobacter pylori* in saliva and
subgingival plaques of adult periodontitis patients

 조선대학교



2004년 8월 일

조선대학교대학원

치 의 학 과

나 명 수

성인형 치주염 환자의
타액 및 치은연하치태에서
*Helicobacter pylori*의 발현양상

지도교수 김 병 옥

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로 제출함.




2004년 4월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

치 의 학 과

나 명 수

나명수의 석사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	김	생	근	
위원	조선대학교	교수	안	종	보	
위원	조선대학교	교수	김	병	욱	

2004년 5월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차	ii
도목차	iii
영문초록	iv
I. 서론	1
II. 연구대상 및 연구방법	3
III. 연구결과	6
IV. 총괄 및 고찰	9
V. 결론	12
참고문헌	13

포 목 차

Table 1. Nucleotide sequence of primers used in nested PCR	4
Table 2. Result of nested PCR from saliva and subgingival plaque from incisors, premolars and molars in the oral cavity of 17 patients	8
Table 3. Detection rate of H. pylori DNA from saliva and subgingival plaque from incisors, premolars and molars in the oral cavity of 17 patients	8

도 목 차

Fig 1. Result of 1st PCR amplification from saliva and subgingival plaques analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis	6
Fig 2. Result of 2nd PCR amplification from saliva and dental plaques analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis	7

Abstract

The Mode of Detection of *Helicobacter pylori* in Saliva and Subgingival Plaques of Adult Periodontitis Patients

Na Myoung-Su

Advisor : Prof. Kim Byung-Ock

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Helicobacter pylori (*H. pylori*) has been associated with the cause of chronic gastritis, peptic ulcers and gastric cancer. Although it may be transmitted through the oral cavity, it is unknown whether the oral cavity acts as a reservoir of *H. pylori*.

The purpose of this study was to investigate the mode of detection of *H. pylori* in oral cavity of adult periodontitis patients with plaque and periodontal pocket which atmosphere is grown well *H. pylori*.

We analysed detection rate of *H. pylori* in saliva and subgingival plaques of 17 adult periodontitis patients without symptoms of gastroduodenal disease by nested PCR. Samples tested comprised saliva and subgingival plaques from central incisor, 1st premolar and 1st molar.

H. pylori DNA was not identified in saliva from all patients. The detection rate in subgingival plaque from incisors, premolars and molars was 5.9%, 5.9% and 17.7%, respectively.

In conclusion, the dental plaque and periodontal pocket (especially, of molars) in adult periodontitis can be favorable reservoir of *H. pylori* and may be the source of infection and transmission of *H. pylori*.

I. 서 론

산성 환경에서 살 수 있을 뿐만 아니라 번식할 수도 있는 매우 특별한 미생물인 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)는 미세호기성(microaerophilous) 및 그람음성의 특징을 지니고 있는 나선형의 운동성 세균으로, 박테리아로부터 뺀어져 나온 긴 꼬리 같은 구조인 몇 개의 flagella을 가지고 있으며 urease라는 특별한 효소를 사용함으로써 위에서 산을 중화할 수 있다. *H. pylori*는 1983년 Barry Marshal과 Robin Warren²⁴⁾에 의해 인간의 위장점막조직검사 표본에서 최초로 분리되었는데 현재 만성위염, 위궤양, 십이지장 궤양 그리고 위암 등의 중요한 원인균으로 알려져 있다^{21,25)}.

*H. pylori*에 전 세계 인구의 절반 이상이 감염되었으나 현재까지도 정확한 전염경로는 잘 알려져 있지 않다. 그러나 일반적으로 *H. pylori*감염은 대부분 어린시절에 감염된 부모나 다른 어린이들과의 긴밀한 접촉에 의해 일어난다고 알려져 있으며 선진국에서 보다는 개발도상국에서 높은 감염율을 보인다⁴⁾.

한편 전염경로가 과정이 명확하지 않지만 인간은 *H. pylori*의 유일한 보균자로서 알려져 있으며 *H. pylori*가 인간의 위장점막, 타액, 치태, 배설물 등에서 발견되기 때문에, 전염경로로는 구강과 구강의 접촉, 위와 구강의 접촉에 의한 감염 그리고 대변에 의한 구강의 오염 등이 제시되고 있다¹³⁾. 이와 같이 구강은 *H. pylori*의 전염에 있어서 중요한 병원체의 서식지로서 주의를 끌고 있는데 Song 등¹⁹⁾ 은 구강 내 치태와 타액에서 13C urea breath test(UBT) 더불어 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction:PCR)법을 이용해 *H. pylori*를 검출하여 구강이 *H. pylori*의 영구적인 서식지가 될 수 있다고 하였으나 Asikainen 등²⁾ 은 치주질환 환자의 치은연하 치태에서 *H. pylori*를 발견하기 위해 *H. pylori* urease gene A로부터 유래된 한 쌍의 프라이머(primer)를 사용하여 PCR법으로 분석한 결과 증폭산물이 모두 나타나지 않아 구강이 *H. pylori*의 서식지가 아니라는 결론을 내렸다.

이러한 결과의 차이는 *H. pylori*를 검출하기 위해 사용되는 진단학적 방법의 차이라고 생각되는데, *H. pylori* 검출을 위하여 사용되는 방법으로는 *H. pylori*에 대한 항체를 검출하는 혈청학적 검사, *H. pylori* urease에 의해 유리되는 CO₂를 이용하는 urea breath

test, PCR방법, urease test(CLO test), 생검조직을 이용하는 조직검사 및 배양 등이 있다^{6,8)}. 하지만 구강 내의 경우에는 배양을 통한 검출을 하기에는 충분한 수의 *H. pylori*가 존재하지 않을 뿐만 아니라, 구강 내의 정상세균총(normal flora)에 urease를 형성하는 세균이 많이 있기 때문에 다른 방법보다는 PCR방법을 이용한 검출방법이 자주 이용되는데, 특히 타액 및 치태를 대상으로 하는 연구에 있어서 다른 방법에 비해 상대적으로 민감도 및 특이도가 높은 nested PCR을 이용하는 검출방법이 최근 널리 사용되고 있다^{1,16)}.

nested PCR을 이용한 최근 연구에서 *H. pylori*가 구강 내 타액이나 치태에서 자주 발견되었다는 보고가 있는데, Song 등¹⁷⁾ 은 위내시경을 시행한 42명 환자의 타액과 치태에서 *H. pylori*를 분석한 결과 환자의 97%에서 구강 내 *H. pylori*가 발견되어 *H. pylori*는 구강 내 정상세균총이라는 결론을 내렸고, Umeda 등²²⁾ 도 치주낭을 가지고 있는 환자가 위장이나 십이지장에서 *H. pylori*를 제거한 후에도 구강 내 *H. pylori*를 보유하고 있었던 환자의 증례를 보고하였다. 이와 같이 구강은 *H. pylori*의 좋은 서식지가 될 수 있으며, 특히 치태와 치주낭은 *H. pylori*의 특성상 좋은 서식환경을 제공할 수 있다. 그러나 *H. pylori*가 구강 내에서 선호하는 서식지는 아직까지도 명확히 밝혀지지 않았다.

이에 본 연구에서는 위·십이지장 질환의 증상이 없는 성인형 치주염을 가지고 있는 환자의 구강 내에서 *H. pylori*가 발견되는 부위를 조사하기 위해 전치, 소구치, 대구치의 치주낭에서 채취한 치은연하 치태와 타액을 가지고 nested PCR을 시행한 결과 다수의 지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 연구대상 및 연구방법

1. 연구대상

조선대학교 치과병원 치주과에 내원한 환자 중 위·십이지장질환의 증상을 가지고 있지 않은 성인형 치주염환자 17명의 구강 내 타액과 하악 우측 중절치, 제1소구치, 제1대구치의 4 mm이상의 치주낭에서 페이퍼 포인트(paper point)를 가지고 치은연하 치태를 채취하여 phosphate buffered saline(PBS)이 담겨져 있는 1.5 ml microcentrifuge tube에 보관하였다.

2. DNA 추출

수집된 표본으로부터 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 먼저 20 μ l의 proteinase K (10 mg/ml), 200 μ l의 binding buffer를 표본이 담겨있는 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣어 혼합하고 60°C에서 10분간 반응시킨 후에 100 μ l의 isopropanol을 넣고 5초 정도 가볍게 혼합한다. 이렇게 혼합된 용액을 준비된 binding column tube에 옮긴 후 8,000rpm으로 1분간 원심 분리하여 여과된 용액을 버리고 이 과정을 혼합액이 없어질 때까지 반복하였다. 혼합액이 완전히 없어지면 500 μ l의 W1 buffer를 column tube에 넣고 8,000rpm으로 1분간 원심분리 후 여과액을 버리고 500 μ l W2 buffer를 column tube에 넣고 8,000rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 이후 여과액을 버리고 12,000rpm으로 한 번 더 2분간 원심분리 하여 ethanol이 남아있지 않도록 제거하고 binding column tube를 멸균된 새로운 1.5 ml tube로 옮겨 100 μ l의 EL buffer를 binding column tube에 넣고 실온에 약 1분간 반응시킨 후 8,000rpm으로 원심분리 하였다. 여과된 용액은 PCR 시행하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

3. PCR 분석

첫 번째 PCR에 사용한 primer는 EHC-U 및 EHC-L이었으며 두 번째 PCR에 사용한 primer는 ET-5U 및 ET-5L을 사용하였다. Li 등¹⁴⁾ 및 Song 등^{6,11,12)} 이 제시한 H.

*H. pylori*의 860bp genomic DNA 염기서열을 이용하여 프라이머(Bioneer, Daejeon, Korea)를 합성하였고 그 염기서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Nucleotide sequence of primers used in nested PCR

Name	Sequence
EHC primers	
EHC-U	5' -CCCTCACGCCATCAGTCCCAAAAA- 3'
EHC-L	5' -AAGAAGTCAAAAACGCCCAAAAAC- 3'
ET primers	
ET-5U	5' -GCCAAATCATAAGTCCGCAGAA- 3'
ET-5L	5' -TGAGACTTTCCTAGAAGCGGTGTT-3'

H. pylori genomic DNA의 첫 번째 PCR을 위해 10 mM Tris-HCl(pH9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 μm의 dNTP, 그리고 1U의 Tag DNA Polymerase가 포함된 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 5 μl의 주형(template) DNA와 EHC-U 및 EHC-L primer (10 pmole/μl) 1 μl씩을 넣고 최종 부피가 20 μl가 되도록 8-mop를 넣었다. 모든 PCR은 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 다음 94°C 45초, 59°C 30초, 72°C 45초로 이루어진 총 40회의 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시켰다.

H. pylori genomic DNA의 두 번째 PCR을 위한 혼합물은 첫 번째 PCR을 시행할 때 사용한 것과 동일한 AccuPower PCR Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 2 μl의 첫 번째 PCR 산물과 ET-5U 및 ET-5L primer (10 pmole/μl) 1 μl씩을 넣고 최종 부피가 20 μl가 되도록 8-mop를 넣었다. 모든 PCR은 첫 온도순환에 앞서 95°C에서 5분간 가열한 다음 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 50초로 이루어진 총 25회의 온도순환 후 72°C에서 10분간 반응시켰다.

한편, 모든 PCR 증폭 시에 음성 대조군(negative control)과 양성 대조군(positive control)도 매번 동시에 증폭하여 오염여부와 위양성의 가능성을 배제하였다. 모든 PCR 과정은 MiniCycler™ (MJ Research, U.S.A)에서 수행하였다.

4. 전기영동

0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 비율로 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel 상에 5 μl 의 PCR 산물을 전기영동 하여 전기영동 후 UV Transilluminator를 이용하여 PCR 산물의 크기를 분석하였다. Marker로는 100bp Ladder (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였다.

Ⅲ. 연구결과

위·십이지장 질환의 증상을 가지고 있지 않은 성인형 치주염 환자 17명의 타액과 하악 우측 중절치, 제1소구치 그리고 제1대구치의 치은연하 치태로부터 추출된 DNA를 주형으로 한 nested PCR이 수행되었다.

1.5% agarose gel 전기영동에서 첫 번째 PCR에서 417bp의 증폭산물은 관찰되지 않았으나 두 번째 PCR에서는 230bp의 증폭산물을 관찰 할 수 있었다(Fig 1, 2).

연구대상 17명 중 5명(29.4%)이 *H. pylori*에 양성반응을 나타내었는데, 타액에서는 모두 음성반응을 나타냈으며, 치은연하 치태에서는 중절치 1명(5.9%), 제1소구치 1명(5.9%), 제1대구치 3명(17.7%)이 양성으로 나타났다(Table2, 3).



M N P S #41 #44 #46 S #41 #44

Fig 1. Result of 1st PCR amplification from saliva and subgingival plaques analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis

M : 100bp DNA Ladder

N : negative control

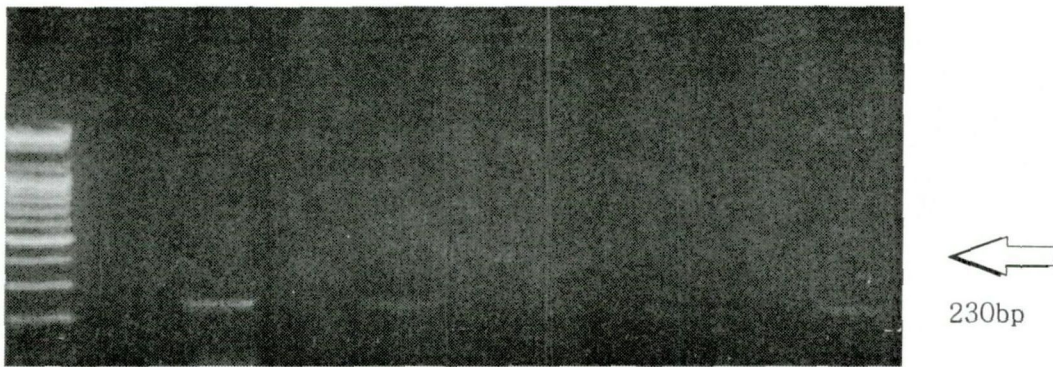
P : positive control (Bioneer, Daejeon, Korea)

S : saliva

#41 : subgingival plaque of central incisor

#44 : subgingival plaque of 1st premolar

#46 : subgingival plaque of 1st molar



M N P S #41 #44 #46 S #41 #44

Fig 2. Result of 2nd PCR amplification from saliva and dental plaques analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis

M : 100bp DNA Ladder

N : negative control

P : positive control (Bioneer, Daejeon, Korea)

S : saliva

#41 : subgingival plaque of central incisor

#44 : subgingival plaque of 1st premolar

#46 : subgingival plaque of 1st molar

Table 2. Result of nested PCR from saliva and subgingival plaque from incisors, premolars and molars in the oral cavity of 17 patients

	saliva	central incisor	1st premolar	1st molar
sample 1	-	-	-	-
sample 2	-	-	-	-
sample 3	-	-	-	-
sample 4	-	-	-	-
sample 5	-	-	-	+
sample 6	-	+	-	-
sample 7	-	-	-	-
sample 8	-	-	-	+
sample 9	-	-	-	-
sample 10	-	-	-	-
sample 11	-	-	-	+
sample 12	-	-	+	-
sample 13	-	-	-	-
sample 14	-	-	-	-
sample 15	-	-	-	-
sample 16	-	-	-	-
sample 17	-	-	-	-

- : absence of *H. pylori*

+ : present of *H. pylori*

Table 3. Detection rate of *H. pylori* DNA from saliva and subgingival plaque from incisors, premolars and molars in the oral cavity of 17 patients

site	saliva	central incisor	1st premolar	1st molar
positive (%)	0(0%)	1(5.9%)	1(5.9%)	3(17.7%)

IV. 총괄 및 고찰

H. pylori는 주로 인간의 위장 내에 거주하며 위·십이지장질환에 중요한 원인 역할을 하지만 타액과 치태에서 H. pylori의 발견은 구강이 사람과 사람사이 H. pylori 전염에 중요한 역할을 할 수 있음을 의미한다⁵⁾. H. pylori가 구강에서 서식할 수 있는 잠재적인 능력은 치태에서 H. pylori, Fusobacterium nucleatum 그리고 Fusobacterium periodontium 사이에 특수한 결합과 관련될 수 있는데, 이러한 선택적인 결합으로 인한 집합체 때문에 치태가 위장 밖에서 H. pylori와 같은 병원체를 위한 서식지로서 제공될 수 있음을 나타낸다³⁾. 또한, 부가적인 특징은 구강상피를 덮고 있는 salivary mucin과 결합하는 능력인데 salivary mucin 위에 sulfated oligosaccharide가 구강표면에 대한 H. pylori의 부착을 위한 수용구조를 제공하기 때문이다²³⁾. Ishihara등⁷⁾은 F.nucleatum과 P.gingivalis가 H. pylori와 응집하는 것을 발견하였으며, H. pylori가 구강 내 다른 박테리아와 응집할 때 H. pylori의 발견율이 높음을 보고 하였다. 이와 같이 H. pylori는 구강 내 정상세균총으로서 존재할 수 있는데 구강 내 H. pylori의 이환율(prevalence rate)에 있어서도 일본인의 경우 Schimada 등¹⁸⁾은 PCR법을 사용하여 24.3%라고 보고하였고, Umeda 등³⁾은 nested PCR법을 사용한 결과 35.1%라고 보고하여 본 연구의 29.4%와 큰 차이를 보이지 않았다.

구강 내 H. pylori를 검출하는 방법에 따라 검출율이 다소 다르게 나타날 수 있는데^{3,15)} 최근에는 특이성이 상대적으로 높은 PCR법이 많이 이용되고 있으며, nested PCR과 같이 일차 PCR산물을 표적으로 하는 primer를 이용하여 이차 PCR을 시행하는 경우 유전자에 대한 검출능이 더 우수하다고 알려져 있다. 구강 내 H. pylori의 PCR을 위한 표적으로 urease A 유전자, urease C 유전자, 860bp genomic DNA 및 16S rRNA 유전자등이 이용되고 있는데, 860bp genomic DNA를 표적으로 하는 PCR방법이 비교적 검출능이 우수하다고 알려져 있다¹⁾. 본 연구에서도 860bp genomic DNA를 표적으로 하는 EHC primer를 선택하였는데, 비록 일차 PCR 산물이 전기영동 후 모든 표본에서 관찰되지 않았다 할지라도 417bp 크기의 일차 PCR 산물을 표적으로 하는 ET primer를 이용하여 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

Nguyen 등¹²⁾의 연구에 의하면 *H. pylori*는 구강 내 균일하게 분포되어 있지 않는데, 일반적으로 치은연하 치태보다는 치은연상치태에서 더 많이 발견되며 전치나 소구치 부위보다는 구치부위의 치태에서 더 많은 발현율을 보인다^{17,22)}. 이와 같은 차이는 *H. pylori*가 미세호기성이기 때문인데, 이론적으로는 전치에서 구치로 갈수록 산소에 대한 노출이 감소되어 구치부위에서 성장이 더 잘 될 수 있음을 의미한다¹⁷⁾. 그리고 구강 내에서 *H. pylori*가 성장하기 위해서는 구강 내 온도, pH, 영양상태, 타액분비율 및 항균물질 등과 같은 다양한 요소들에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에^{10,24)} 세균집단의 성장부위가 위치에 따라 달라 질 수 있어 구강 내 *H. pylori*의 검출을 위해 표본을 채취할 때 서로 다른 부위에서 표본을 수집하는 것이 중요하다.

치은연하 치태에서 *H. pylori*의 검출에 대한 연구에 있어서는 Asikainen 등²⁾은 PCR법을 사용하였음에도 전혀 발견하지 못했으나, Umeda 등³⁾은 nested PCR법을 이용하여 치주낭의 깊이가 4mm이상과 4mm미만의 기준에 따라 채취한 치은연하 치태에서 발현율에 차이는 있었다 할지라도 *H. pylori*가 치은연하 치태에도 존재할 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서는 *H. pylori*가 타액에서는 발견되지 않았지만 4mm이상의 치주낭에서 채취된 치은연하 치태에서는 발견되었고, 전치 부위, 소구치 부위보다는 구치부위의 치은연하 치태에서 더 많이 발견 되었다. 이와 같은 결과들을 볼 때 *H. pylori*는 치주낭이나 치태에서 발견되는데, 만약 치주질환에 이환되었을 경우 치주낭과 치태와 같은 구강 내 환경은 *H. pylori*의 성장에 좋은 환경을 제공할 수 있을 뿐 만 아니라 구강을 통한 감염과 전염에 중요한 장소가 될 수 있음을 알 수 있다.

부가적으로 구강 내 *H. pylori*의 존재는 구강이 위장 내에 *H. pylori*의 완전한 제거 후에도 재감염의 잠재적인 원천이 될 수 있음을 의미하며, 구강에서 구강으로의 경로를 통한 사람사이의 전염이 될 수 있음을 의미 한다²⁰⁾. 한편 Okuda 등¹⁴⁾의 항균 구강세척제(antimicrobial mouthrinse)에 대한 효능의 연구에서 항균 구강세척제는 10초에서 30초안에 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *H. pylori*, *Candida albicans*와 같은 미생물을 죽일 수 있는 능력이 있음을 입증하였다. 이러한 사실로 볼 때 치주질환환자는 구강 내 감염성 세균 뿐 만 아니라 *H. pylori*와 같은 세균의 감염조절을 위해 항균 구강세척제의 사용을 추천한다.

본 연구는 성인형 치주염을 가지고 있는 환자의 구강 내에서 *H. pylori*가 발현되는 양상을 조사하기 위한 실험논문으로서 연구결과는 임상적 의미가 있을 것으로 사료되며, 향후 좀 더 정확한 평가를 위해서는 생화학적 분석과 분자생물학적 연구가 함께 이루어져야 할 것으로 사료된다.

또한 광범위하게는 내과적으로 위장 내 *H. pylori*가 감염되었다고 진단된 성인형 치주염 환자의 구강 내에 대한 평가 및 비교도 함께 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

H. pylori는 만성위염, 위궤양 그리고 위암의 발생과 관련성이 있다. 이러한 H. pylori가 구강을 통해 전염된다 할지라도 구강 내 주로 서식하는 장소는 잘 알려져 있지 않으므로, 치태와 치주낭과 같은 H. pylori의 좋은 서식장소가 될 수 있는 환경을 가지고 있는 성인형 치주염 환자에서 H. pylori가 발현되는 양상을 조사하기 위해 본 연구를 시행하였다.

위·십이지장 질환의 증상을 가지고 있지 않는 성인형 치주염 환자 17명의 타액과 전치, 소구치 및 대구치의 치은연하 치태에서 H. pylori의 검출을 위해 nested PCR법을 사용한 결과, 타액 내에서는 검출되지 않았으나 치은연하 치태에서는 전치에서 1명(5.9%), 소구치에서 1명(5.9%) 그리고 대구치에서 3명(17.7%)이 양성으로 나타났다.

이상의 연구결과를 종합해보면, 성인형 치주염 환자에서 치주낭과 치태는 H. pylori의 성장에 좋은 환경을 제공해 주고 특히 대구치에서 가장 높은 양성 반응율을 보인 것은 대구치의 치주낭과 치태가 치아의 다른 부위보다 H. pylori의 중간 서식지로서의 가능성이 높다는 결론을 얻었다.

참고문헌

- 1) 김현철·김재홍·이상섭·신경진·최종훈·김종열. "재발성 아프타성 궤양 환자에서 *Helicobacter pylori*의 발현정도 및 병인과의 상관성." 「대한구강 내과학회지」 27(4):401-413, 2002.
- 2) Asikainen, S., Chen,C., Slots,J. " Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction." *Oral Microbiol. Immunol.* 9(5):318-320, 1994.
- 3) Andersen,R.N., Ganeshkumar,N., Kolenbrander,P.E. " *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium* spp." *Oral Microbiol. Immunol.* 13(1):51-54, 1998.
- 4) Dupont,C., Benhamou,P.H., Kalach,N., Raymond,J. "*Helicobacter pylori* infection in children." *Rev. Prat.* 50(13):1437-1441, 2000.
- 5) Dowsett,S.A., Kowolik,M.. " Oral *Helicobacter pylori* : Can we stomach it ?" *Crit. Rew. Oral Biol. Med.* 14(3):226-233, 2003.
- 6) Fabre,R., Sobhani,I., Laurent-Puig,P., Hedef,N., Yazigi,N., Vissuzaine,C., Rodde,I., Potet,F., Mignon,M., Etienne,J.P. " Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens : Comparison with culture rapid urease test and histopathological tests." *Gut.* 35(7):905-908, 1994.
- 7) Ishihara,K., Miura,T., Kimazuka,R., Ebihara,Y., Mizuno,Y., Okuda,K. " Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth." *FEMS. Microbiol. Lett.* 152(2):355-361, 1997.
- 8) Kosunen, T.U., Megr명, F. " Diagnosis of *Helicobacter pylori*." *Curr. Opin. Gastroenterol.* 11:5-10, 1995.
- 9) Li,C., Musich,P.R., Ha,T., Ferguson,D.A.Jr., Patel,N.R., Chi,D.S., Thomas,E. " High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay." *J. Clin. Pathol.* 48:662-666, 1995.
- 10) Marquis,R.E. " Oxygen metabolism , oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms." *J. Ind. Microbiol.* 15:198-207, 1995.

- 11) Minah,G.E., Solomon,E.S., Chu,K. " The association between dietary sucrose consumption and microbiol population shifts at six oral sites in man." Arch. Oral Biol. 30:397-401, 1985.
- 12) Nguyeu,A.M., Engstrand,L., Gento,R.M., Graham,D.Y., el-Zaatari,F.A. " Detection of Helicobacter pylori in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction." J. Clin. Microbiol. 31:783-787, 1993.
- 13) Oderda,G. " Transmission of Helicobacter pylori infection." Can. J. Gastroenterol. 13(7):595-597, 1999.
- 14) Okuda,K., Adach,M., Lijima,K. " The efficacy of antimicrobial mouth rinses in oral health care." Bull. Tokyo Dent. Coll. 39(1):7-14, 1998.
- 15) Pytko-Polonczyk,J., Konturek,S.J., Karczewska,E., Bielanski,W., Kaczmarczyk-Stachowska,A. " Oral cavity as permanent reservoir of Helicobacter pylori and potential source of reinfection." J. Physiol. Phamacol. 47(1):121-129, 1996.
- 16) Song,Q., Haller,B., Schmid,R.M., Alder,G., Bode,G. " Helicobacter pylori in dental plaque. A comparison of different PCR primer sets." Dig. Dis. Sci. 44:479-484, 1999.
- 17) Song,Q., Lange,T., Spahr,A., Alder,G., Bode,G. " Characteristic distribution pattern of Helicobacter pylori in dental palque and saliva detected with nested PCR." J. Med. Microbiol. 49(4):349-353, 2000.
- 18) Shimada,T., Ogura,J., Ota,S., Terano,A., Takahashi,M., Hamada,E., Omata,M., Sumino,S., Sassa,R. " Identification of Helicobacter pylori in gastric specimens, gastric juice, saliva and faces of japanese patients." Lancet. 343:1636-1637, 1994.
- 19) Song,Q., Spahr,A., Schmid,R.N., Alder,G., Bode,G. " Helicobacter pylori in the oral cavity : high prevalence and great DNA diversity." Dig. Dis. Sci. 4(11):2162-2167, 2000.
- 20) Tursi,A., Commarota,G., Papa,A., Cuoco,L., Gentiloni,N., Fedeli,G., Gasbrrini,G. " The modes of transmission of Helicobacter pylori infection." Recenti. Prog. Med. 88(5):232-236, 1997.

- 21) Tytgat,G.N., Noach,L.A., Rauws,E.A. " Helicobacter pylori infection and duodenal ulcer disease." Gastroenterol. Clin. North Am. 22:127-139, 1993.
- 22) Umeda,M., Kobayashi,H., Takeuchi,Y., Hayashi,J., Morotome-Hayashi,Y., Yano,K., Aoki,A., Ohakusa,T., Ishikawa,I. " High prevalence of Helicobacter pylori detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients." J. periodontol. 74(!)129-134, 2003.
- 23) Veerman,E.C., Bank,C.N., Namavar,F., Appelmelk,B.J., Bolscher,J.G., Nieuw Amerongen,A.V. " Sulfated glycans on oral mucin as receptors for Helicobacter pylori." Glycobiology. 7(6):737-743, 1997.
- 24) Warren,J.R., Marshall,B. " Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis." Lancet. 1:1273-1275, 1983.
- 25) Wotherspoon,A.C., Ortiz-Hidalgo,C., Falzon,M.R., Lsaacson,P.G. " Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma." Lancet. 338:1175-1176, 1991.