专家论坛

II类洞充填体示踪剂微渗漏评价与扫描电镜定量分析的比较

Microleakage of Class II Restorations with Different Tracers — Comparison with SEM Quantitative Analysis

Siegward Heintze/Monika Forjanic/Andrea Cavalleri

原载 The Journal of Adhesive Dentistry, 2008;10(4):259-267(英文)

吕 平 译 岳 林 审

摘 要

目的:①比较II类洞充填体微渗漏体外试验中最常用的三种示踪剂的渗透深度(DP)和扫描电镜(SEM)定量分析数据间的差异;②根据得到的结果评估上述两种试验方法对含有12个样本的资料的辨别能力。**材料和方法**:在36颗无龋离体下颌第一磨牙上制备标准的II洞型,近中龈阶位于釉牙骨质(CEJ)上1mm,远中龈阶位于CEJ下1mm,殆面宽度为牙尖间距离的70%,用Teric EvoCeram/AdheSE树脂水平分层充填,每层厚度为2mm,光照20s(1 200mW/cm²),完成充填后用细金刚砂钻和金刚砂盘抛光。所有样本进行殆向加载试验(1 200 000循环,49N/1.7Hz)和模拟温度循环试验(3 000个循环,5℃/55℃)。用扫描电镜(SEM)评价牙颈部釉质和牙本质的连续性边缘的百分寿命。将测试牙浸泡于三种示踪剂中进行渗透,三种示踪剂分别是0.5%碱性品红(24h,37℃),2%亚甲基蓝(24h,37℃)和50%硝酸银溶液(4h,37℃,之后置于显影液中8h,再荧光照射过夜)。将牙近远中向剖开两次。在立体显微镜下测量示踪剂的渗透深度并计算每一位点的平均值。由于数据的多相性和非正态分布,SEM和渗透深度的数据都经过相应的数据转换。根据标准差和统计学误差计算样本量。**结果**:示踪剂中品红和硝酸银在牙本质界面的渗透深度与SEM的结果有可接受的相关性,统计值分别为Pearson=−0.74,$P<0.01$和Pearson=−0.79,$P<0.01$。而SEM数据与亚甲基蓝渗透结果没有相关性。三种示踪剂在釉质界面的示踪渗透深度与SEM的结果均没有相关性,三者间的差异也无统计学意义(Kruskal Wallis,$P>0.05$)。三种示踪剂在牙本质界面的渗透深度显著高于在釉质界面的渗透(Wilcoxon,$P<0.05$)。当示踪剂样本量为12个标本时,示踪剂渗透仅能在釉质边缘1mm和牙本质边缘2mm的范围内对不同材料有所区分。**结论**:在牙本质边缘用品红或硝酸银作为渗透的示踪剂与SEM定量边缘分析间有中等相关性,在釉质边缘则无相关。

关键词 微渗漏;边缘分析;修复体;示踪剂;牙本质粘接

专家点评

岳林教授点评:长期以来,牙齿修复体的边缘渗漏问题一直是人们关注的热点,文献中经常会见到对各种材料和各种修复技术进行材料与牙体组织间的渗漏评价研究,所采用的试验方法也是各种各样,导致各研究结果变异很大,难于比较,更难于解释临床实际问题。本文在全面回顾了该领域的文献后,对微渗漏测定的两种常用方法(染料渗透示踪法和扫描电镜界面形态评估法)进行了比较研究。本文的特色是敏锐地指出了目前渗漏研究中存在问题,并进行了较深入地思考和分析,前言和讨论是最精彩的部分,值得细读。

译者 北京大学口腔医学院牙体牙髓科
北京海淀区中关村南大街22号 100081

充填体边缘的完整性一直为临床医师所关注，因为边缘完整性的破坏会导致边缘变色和继发龋。临床上需2～3年的时间才可以明确看到充填体边缘变色和继发龋的指征。因此，研究者利用体外试验来评估离体牙上充填体边缘的完整性。最常用的试验方法是使用不同示踪剂来检测充填体与牙体组织界面间的微渗漏，继而以显微镜评估充填体的边缘。截至到2006年的文献回顾，MEDLINE中有877项关于微渗漏方法的研究，其中87项是显微镜评估充填体边缘的报道。

微渗漏与细菌和液体的侵入相关，从而导致术后敏感、边缘变色、继发龋，甚至最终发展为不可复性牙髓炎。微渗漏的检测方法有：将充填Ⅱ类洞／Ⅴ类洞的牙齿放置于不同示踪剂中，如有机示踪剂（品红、亚甲基蓝、若丹明、藻红、曙红等）、硝酸银、放射性标记物（$^{45}CaCl_2$）、细菌渗透，或用液体（如盐水）的动力学流动系统来测试。示踪方法的技术优势在于其简单且可检测到表层下方的边缘渗透；其不足包括对样本的破坏和经切割后对界面只能做部分分析。目前微渗漏试验的主要缺点是缺少公认的、与临床相关的循证指标，在国际上尚没有标准化的检测方法。一篇关于充填材料微渗漏试验的综述指出，由于使用不同检测方法及参数，使得试验结果之间差别巨大而无法比较。除此之外，影响因素还有使用示踪剂渗透前标本的处理方式不同（有无温度加载）、微渗漏的试验方法不同，如渗透的时间、温度、示踪剂的种类、切割过程以及示踪剂渗透深度的定量检测等等。目前尚没有系统评估不同示踪剂与粘结剂或与牙体组织间相互作用的研究，仅有一项研究对比了三种不同示踪剂在Ⅱ类洞充填体的渗透深度。

显微镜边缘分析法的优势在于可以对整个充填体的边缘进行观察，且因不破坏样本，可以做长期评估。然而，此方法也存在其局限性，例如无法检测充填体表面下方的外充填体和牙体组织界面，在样本观察过程中由于视觉缺陷导致假象出现。

迄今为止尚没有对微渗漏试验方法本身的影响因素所作的系统评估。因此，如果根据实验室试验的国际标准，上述两种试验方法都是无效的。然而，令人吃惊的是仍能看到许多研究使用这些方法，并且通过试验结果推荐某些材料的临床应用、材料的联合使用以及某项操作技术的开展。尽管如此，上述两种试验方法都出现在对牙齿粘接试验的ISO技术说明书上，也没有对这两种方法所存在不足的评估标准。对于这两种方法，ISO推荐在第三磨牙颊侧面制备直径为3mm的圆柱状窝洞，其洞壁既要位于牙釉质或经打磨后的牙釉质上，也要位于牙本质上。没有推荐特殊的示踪剂；室温下无论哪种示踪剂的渗透时间都应为24h。如果加载温度循环，推荐500周次的足量循环。应在标本上选择两个部位进行切开，使用10倍显微镜测量示踪剂的渗透深度。说明书指出，对于裂隙的测量，应使用测量显微镜在最宽处进行检测。

尽管也关注两种方法间的相关性，但仅有少量的研究，其结果显示，在离体牙实验中示踪剂渗透深度与裂隙的出现、边缘不规则等因素没有或仅有较弱的相关性。其中有三项研究，研究目的不是探寻不同方法之间的相关性，而是用两种方法评估不同的材料或者操作者的技术水平。

“体外效度”用以说明体外试验与临床试验之间的相关性，对于医疗产品而言，一种实验室检测方法应该用以预测材料的临床使用或者操作步骤。然而，近期对边缘分析和临床结果相关性的系统文献回顾显示，在不同材料之间的比较研究中，无论示踪剂的渗透或显微镜的边缘评估均与临床表现不相关，如边缘变色、继发龋、边缘缺损或固位丧失。

基于以上的综述，由于与临床没有强相关性，我们本应舍弃这些检测方法。然而，一种新材料临床试验之前，仍然运用这些方法作为筛选，且需要对其有效性进行确认，这是一个复杂的过程，是产生一种材料或者一项技术的客观指标。值得注意的是，边缘分析中完全没有涉及的问题有两方面：①不同种类的示踪剂可否产生相似的结果；②示踪剂的渗透深度与显微镜评估边缘完整性二者之间是否相关？目前，在文献中尚没有报道在同一个试验中同时涉及这两个问题的研究。

本项研究目的侧重于两方面：①用离体实验对Ⅱ类洞充填体的示踪渗透与SEM的边缘分析数据进行评估，示踪试验采用品红、亚甲基蓝、硝酸银这三种最为常用的示踪剂，检测其渗透深度。②比较这些示踪剂在Ⅱ类洞充填体边缘的渗透程度。进而，在确定好标本量的样本上，确立这两种试验方法的辨别能力。

本研究提出的假设是：①示踪剂渗透深度与

SEM 边缘数据分析间无相关性；②各种示踪剂渗透的深度没有差异。

材料和方法

切片准备

从德国柏林各诊所所拔除的牙中选择 36 颗无龋、无修复体的人下颌第一、第二恒磨牙，供者的年龄未知。牙齿被拔除后，用手工器械大致清洁，并用 90% 的酒精浸泡几分钟消毒，然后将牙齿置于自来水瓶中，冰箱中保存。回到实验室后，仔细清洗，浸泡于0.2%叠氮化钠消毒液中冰箱储存1周。之后，将储存液换为自来水。在 36 颗牙在经过温度加载循环后，在三种示踪渗透法中，每 12 颗牙被随机分配到其中一种方法中。随机化的标准是基于牙齿的种类（下颌第一、第二磨牙）和大小。

先在立体显微镜下用记号笔标记出牙齿的釉牙本质界，再以 40 000rpm 转速（Combident unit，KaVo；Biberach，Germany）于镜下做牙体预备，备洞时需有充足的水冷却。在牙体预备完成后，再用蘸少量酒精的棉球去除标志点。

用牙周探针和电子量角规（PAV，Mahr；Göttingen，Germany）测量窝洞的所有尺寸：近中邻面箱形，高于釉牙骨质界 1mm；远中邻面箱形，低于釉牙骨质界 1mm。邻面箱体颊舌径为 5mm，深度 1.7mm，内角圆钝。殆面部分：位于牙尖之间距离的 70%，深 3.2mm，无洞斜面，仅用金刚砂钻针的尖头磨掉洞缘的锐边。

牙体预备由不同粒度的金刚砂钻针完成(Intensiv；Lugano，Switzerland，8614 FG，80μm；3614 FG，25μm)。

将样本牙的一半牙根截除，用双重固化树脂 Variolink Ⅱ将其固定在扫描电镜的支架上(Ivoclar Vivadent：Schaan，Liechtenstein)，再把它安装在一个以义齿牙模拟邻牙的定制模型上。在预备的样本牙周围放置一个钢成形片（SuperMat，Kerr Hawe；Bioggio，Switzerland），用张力调整仪(SuperLock，Kerr Hawe)将其拉紧，邻间区域插入木楔。使用两步法自酸蚀粘接系统AdheSE (Ivoclar Vivadent，batch No F24406)，将酸处理液涂在釉质和牙本质，并用小刷子在MOD洞的三部分（近/远中邻面箱体，殆面箱体）内涂擦 30s。之后，用压缩空气吹散处理液，下一步涂布粘接剂，也用压缩空气轻轻吹散。再用 Astralis 10 光敏灯(Ivoclar Vivadent)以 650mW/cm² 固强度化粘接剂 10s。在每组修复体（n=6）操作前，都先用 Demetron 光强检测计(Model 100，Kerr；Orange，CA，USA)检测固化灯。充填时采用统一的水平分层技术充填复合树脂材料 Tetric EvoCeram(Ivaclar Vivadent，batch No F28887)：

第一层：邻面洞内的牙本质边缘处水平填入厚度 1mm；釉质边缘处水平填入厚度 2mm

第二层：邻面洞洞内（牙本质边缘处）水平填入厚度 2mm

第三层：殆面洞和邻面洞内水平填入厚度 1mm

第四层：殆面洞和邻面洞的颊侧斜层填入

第五层：殆面洞和邻面洞的舌侧斜层填入

用 Astralis 10 光敏灯(Ivoclar Vivadent）以 1 200mW/cm² 强度固化复合树脂 10s，在其殆面预备出沟槽形状，以与 Empress 循环载荷试验中的压头形态相匹配。

在充填即刻，冷却水伴随下用 Sof-Lex（3M ESPE)抛光盘去除邻面边缘的多余材料，抛光盘的型号为1982C，M，F，SF（批号：P030124，P060508，P030204，P021213）。在殆面，用 FG 4250 金刚砂完成钻（25 μm）伴少量水将充填体边缘显露出来，对难以到达的边缘则用 8 μm 的金刚砂完成钻针完成。最后，用 Sof-Lex 1982 SF 抛光系统将整个充填体抛成高度光滑的表面。将样本置于 37℃ 去离子水中保存 7 天，用尼龙刷和牙膏去除任何可能存在的杂质。之后，将一组 6 个样本置于咀嚼模拟器中，模拟条件是：温度循环（5℃/55℃）3 000 周次，1.7Hz 频率49 N的载荷循环的1 200 000周次，直径2.36mm 的标准双上釉柱状压头由瓷材料 Empress（Ivoclar Vivadent）制成。咀嚼模拟器另有描述。

材料边缘的 SEM 定量分析

经过温度机械加载后，用聚乙烯硅氧烷印模材（Vitual Extra Light，Ivoclar Vivadent）制取充填体印模，以灌制用于扫描电镜分析的充填体复制品。在印模内灌注环氧基树脂(Stycast，Grace N.V.；Westerlo，Belgium)。用 SEM（Zeiss DSM 962；Jena，Germany）以200倍放大倍数分析复制品，以确定在颈部牙本质和釉质边缘的连续性百分比。连

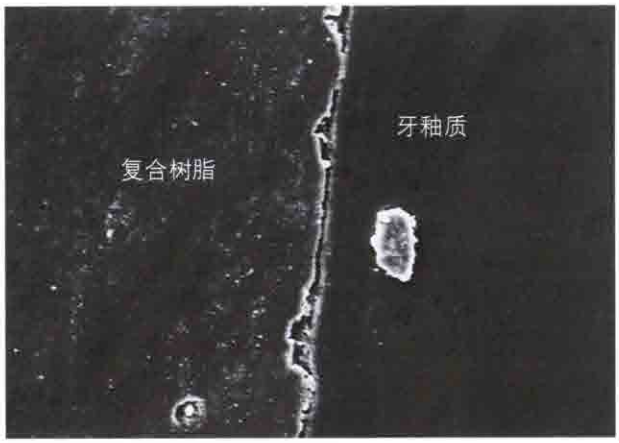

图1a Ⅱ类洞充填体颈部釉质界面SEM图像(500X)，在温度机械加载后显示不连续的边缘

图1b Ⅱ类洞充填体颈部牙本质界面SEM图像(500X)，在温度机械加载后显示连续的边缘

续的边缘被定义为无缺口、无不规则处，无折裂。图1显示连续性的边缘和有裂隙的边缘。

示踪渗透

在一组充填好的牙（$n=6$）完成咬合加载试验后，用同一示踪剂做示踪渗透。距充填体边缘0.5mm以外区域涂布两层指甲油。所有的示踪剂溶液都新鲜配制，固定于含氢氧化钠的pH中性溶液中。置于0.5%品红和2%亚甲基蓝溶液中的样本牙，在37℃条件下示踪渗透24h；置于硝酸银中的样本牙示踪渗透4h，然后，被放在显影剂（Ilfoso S；Ilford，UK）中8h并于紫外灯下过夜，以将银离子固定在牙中。

做完示踪渗透后，清洗牙齿，用尖刀片去除指甲油，然后用环氧树脂材料（Castolite Buehler，Düsseldorf,Germany）包埋。接下来，用带有多齿金刚刀片的低速锯（Isomet,Buehler；Lake Bluff，IL，USA）将样本从近远中方向切割2次，这样每个切片和位置就有4个测量的位点。颈部的牙本质和釉质分别测量。测量参数是从充填体外表面到充填体／牙本质界面的示踪渗透深度。深度由带CCD照相机和表面分析系统的立体显微镜（Analysis 5.0，SIS;Münster,Germany）测量。图2，显示示踪渗透样本。

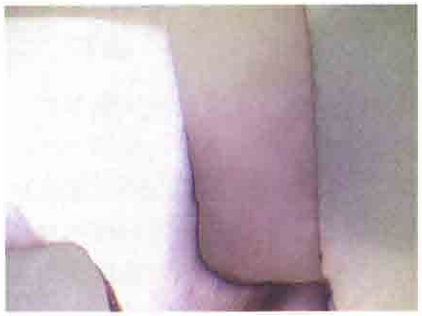

图2a 品红在邻面颈部充填体和硬组织界面的示踪渗透

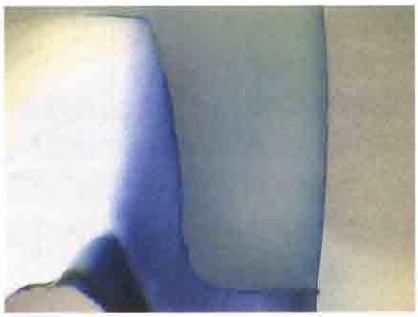

图2b 亚甲基蓝在邻面颈部充填体和硬组织界面的示踪渗透

图2c 硝酸银在邻面颈部充填体和硬组织界面的示踪渗透

数据分析

用SPSS 11.01(SPSS;Chicago,IL,USA)进行数据分析。由于数据的变异和不规则分布，有必要对原始数据进行转换。对于SEM数据，使用对数转换；而对于示踪渗透的数据，则选择了平方根转换。

为了评价两个分析方法的相关性，采用了Pearson 相关性分析。为了检测三种示踪剂之间是否有差异和评价三种示踪剂和SEM 之间的有无差异，采用了非参数性Kruskal Wallis检验。显著性水平定在$P<0.05$。

根据下列公式计算示踪渗透和SEM 分析的辨别能力：

$\gamma = sd\sqrt{2c/n}$。

其中，v 是指具有分辨能力的衡量值，将会有统计学显著性。n 是切片的数量；c 是基于双尾检验的乘数值，由下列公式计算：

$c=[z1(\alpha/2)+z(1-\beta)]^2$

这里，α是Ⅰ类误差，β是Ⅱ类错误，在z(x) 中x 是标准正态分布中的分位数。$\alpha=0.05$，$\beta=0.2$，$c=(1.96+0.84)^2=7.85$。

结果

在釉质和牙本质边缘，三种示踪剂和SEM 定量分析的差异没有统计学意义（表1、图3）。在牙本质界面，用品红和硝酸银做示踪渗透和SEM 边缘定量分析结果间有可接受的相关性（图4），而在釉质界面却没有相关性(图5、表2)；用亚甲基蓝在任何邻面做示踪渗透的结果差异无显著关性；无论在釉质界面还是牙本质界面，三种示踪剂之间的示踪渗透深度没有统计学意义（表1）。示踪剂的渗透深度在结果上变异很大，尤其是亚甲基蓝在釉质界面和牙本质界面的结果。硝酸银在釉质界面的渗透结果变异性最小（图3）。

三种示踪剂，在牙本质界面示踪渗透的显著性差异要高于釉质界面（表2、图3）。但是对于牙本质和釉质边缘的SEM 边缘分析数据却没有差异。

用品红或硝酸银示踪渗透时，12 个标本的样本辨别能力只是在釉质边缘1mm 和牙本质边缘2.2mm 范围内，两组间差异的统计学显著性才会被检测到（表3）；对于亚甲基蓝，这种差异必须更大；对于SEM 分析，36 个标本的样本辨别能力是，牙本质连续边缘的百分比为18%，釉质连续边缘的百分比为16%；12 个标本量的辨别能力是，牙本质连续边缘的百分比为27%，釉质连续边缘的百分比为35%。

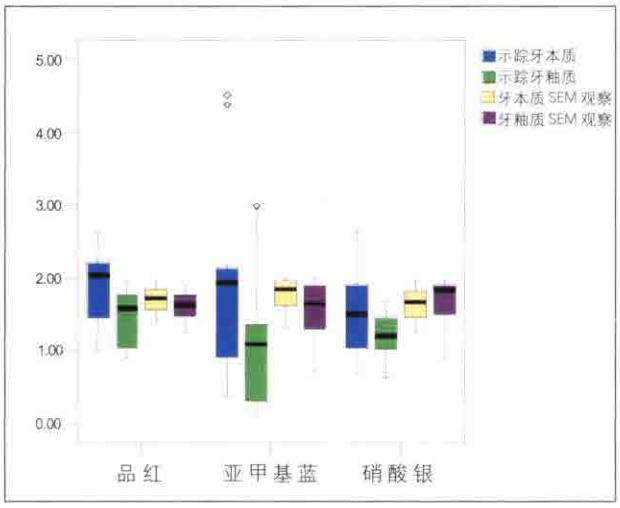

图3 示踪渗透深度的转换数据（$mm^{1/2}$）与SEM对颈部釉质界面和牙本质界面的定量分析转换数据（数学对数，lg%）的箱状图

表1 三种示踪剂间以及示踪剂和SEM 定量分析数据间的Kruskal Wallis检验结果

	牙本质		牙釉质	
示踪剂	卡方值	P 值	卡方值	P 值
SEM	2.4	0.3	1.2	0.5
示踪剂	3.8	0.1	2.1r	0.3

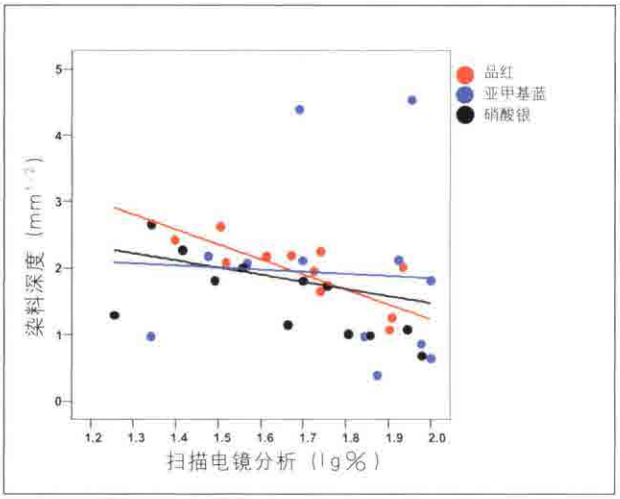

图4 牙本质界面的示踪渗透深度（$mm^{1/2}$）与SEM边缘连续性分析（lg%）的散点图

表2 三种示踪剂在颈部釉质和牙本质边缘差别的Wilcoxon检验（Z）

示踪剂	Z值	P值
品红	−2.3	0.02
亚甲基蓝	−2.7	0.008
硝酸银	−2.7	0.008

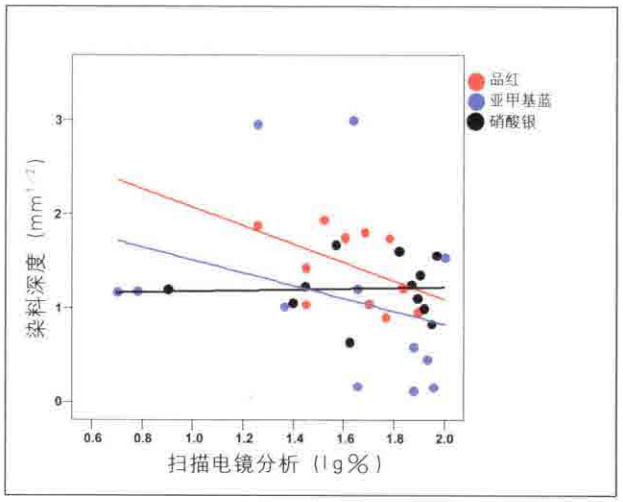

图5 釉质边缘的示踪渗透深度（mm$^{1/2}$）与SEM边缘连续性分析（lg%）的散点图

表3 含12个标本的样本中，三种示踪剂在颈部釉质界面和牙本质界面的辨别能力

示踪剂（n=12）	牙本质（mm）	牙釉质（mm）
品红	2.13	1.30
亚甲基蓝	8.0	3.65
硝酸银	2.26	0.88

讨论

本研究结果表明，部分否决第一个假设，接受第二个假设。仅在牙本质边缘，品红和硝酸银的示踪渗透与SEM定量边缘分析具有相关性；而亚甲基蓝并不适合用作示踪剂。这三种染色剂在示踪渗透上没有显著的差异。

在一篇文献颈部中，这三种示踪剂被用于比较研究，这篇颈部文献分析了144个有关微渗漏的研究，统计结果为，品红使用最多(40.7%)，其次是亚甲基蓝(22%)和硝酸银(17%)。亚甲基蓝虽是一种较为灵敏的示踪剂，但在常温和暴露于光线下时，该化学溶液并不稳定。在碱性环境下，其易于生成没有颜色的无色亚甲基蓝；在有强酸时也不稳定。因此，品红和亚甲基蓝溶液常用碱性溶液滴定至中性pH值，但也不能排除示踪剂与残留的酸性粘接处理剂之间可能会有相互作用，这可以部分解释为什么亚甲基蓝组的渗透示踪结果有较大波动。

每个示踪剂组的样本量的数量可能太小以致于各组之间的差异难以区分。上面提到的那篇综述表明了2/3的研究所用的样本量只有10个或更少，这是一个很严重的缺陷，样本量不足是最常出现的统计验证力低的原因。一个Ⅱ类洞充填体的体外渗透的实验表明，每组至少30个样本，才有80%的可能性能得到两组间P值为0.05的具有统计学意义的差异。通过计算根管封闭剂的微渗漏所需的样本量，也得到相似的结果。根据本研究结果，当12个样本时，示踪剂间差别只有在渗透深度为1～2mm范围时才能被辨别出来。

所有的样本在同一时间接受机械和温度载荷。单纯的温度循环对示踪剂的渗透没有影响，对边缘适合性的影响也微不足道。机械加载能否增加示踪剂的渗透尚不明确。边缘适合性是边缘质量的一个决定因素，这个观点经常在一些研究中提及。本研究中，以49 N对样本加载了1 200 000个循环周次。

另一个技术性的问题是，在水冷却下金刚砂锯切割标本时，有机染料可能会随之分解或冲走。而用硝酸银时则不会出现这样的问题，因为其所经历的化学反应是不断减少显影液中的底物。要减少染料的分解，可以用煤油或油等代替水，或用光固化的单体比如HEMA等来固定染料。但是目前没有文献报导使用过这些方法。

通过Ⅱ类洞充填体的显微镜评估结果显示，微渗漏的部位和与继发龋最常出现的部位一致，即Ⅱ类洞邻面的龈阶。这是一个很关键的部位，由于难以清洁，而且氟化物不易达到，所以这个部位的致龋生物膜不易被破坏。在临床上不同材料之间的微渗漏和边缘分析研究的差别还没有得到证实，因为还有其他影响因素，比如医师的操作技能可能产生较宽的间隙，患者的龋活性等。

另一个重要问题是牙的切片数。大部分的研究(近50%)只将牙切开了1刀，20%的研究切了2刀。因为不同部位的边缘质量不一样，所以，切开的部位越多，示踪渗透的分析就越精确，这是通识的基

本道理。一项由三个试验中心组成的比较对照研究显示，切片数越多，不同试验中心之间、渗透分析与标准之间的一致性就越高。另外，若使结果越精确，就应该采用耗时更多的方法。如用抛光设备逐步减低牙齿和修复体(磨损的方法)，记录每一步的微渗漏量，并将示踪渗透的图像进行三维重建。与前者比，用水杨酸甲酯清洁的方法耗时较少。

与将牙齿切片或研磨不同，把牙齿放在硝酸中溶解后，就能提取染料并用分光光度计计量。在一个三种粘接系统的比较研究中，对V类洞充填体的染色计量结果基本相同，但对根管封闭剂的测量结果则不相同。然而，常用的染料如亚甲基蓝或品红在硝酸或者其他酸性环境中并不稳定。

在牙本质界面上，仅品红和硝酸银的示踪剂渗透和SEM边界分析结果有中度相关性，而亚甲基蓝没有。在牙釉质界面上，任何一种示踪剂的分析结果都没有相关性。这与Manhart等的研究结果不同，他用5%的亚甲基蓝和SEM评价了V类洞充填体中9种粘接系统的边缘封闭性，对比微渗漏和SEM数据，发现与牙本质界面无相关性，而与釉质界面中度相关。

在SEM上看见完美的边缘并不表示染色剂没有渗透。一个对V类洞充填体的研究表明，虽然观察到完好的边界，但仍有20%的窝洞壁有示踪剂渗入。几乎所有的示踪剂渗透都与裂隙的存在有关。其他对II类洞充填体的研究显示，温度机械加载后，完好边界和示踪剂渗透间的相关性很弱或无相关性。一个对II类洞充填体的研究评价了三种示踪剂的渗透作用，罗丹明B渗透最深，放射性钙离子其次，亚甲基蓝最浅。在本研究中，所有牙齿都用三种示踪剂依次处理，然后比较渗透深度。然而，我们并不清楚，在同一个牙齿上依次使用示踪剂后，第二种使用的示踪剂是否仍会象第一种一样地进行渗透，而不发生两者间的化学协同或阻碍作用。另一个研究中，龋齿检知液（1%酸性红+丙二醇）在圆柱状充填体边缘的显色和SEM边缘定量分析间有明显的相关性。

在微渗漏研究中的一个普遍认识是，对于同一个牙齿和充填体内，牙本质界面上示踪剂的渗透比在牙釉质界面上更显著，且与粘接系统和洞型设计无关。虽然SEM对牙本质界面和牙釉质界面的分析结果并无不同，但许多研究都发现，牙釉质的连续边缘比牙本质高。

一篇关于修复材料的染色渗透研究的系统性回顾文献表明，由于方法学参数的很大变异，而不能得出比较研究的结果。例如，对Prompt-L-Pop粘接系统在V类洞充填的微渗漏研究中，Prompt-L-Pop与另一种自酸蚀系统进行比较，经过温度循环后，两者的染色渗透深度相同；但与两步法的酸蚀粘接系统或两步法自酸蚀系统比较，则显示有较多的渗漏；也有显示渗漏更少的研究。在对窝沟封闭剂和V类洞充填体进行多中心研究时，即使用同一种材料以相同的步骤进行试验，如果将同意部分的研究数据进行再次分析，也会产生不同的结果。因此，试验方法的可重复性受到了质疑，然而可重复性是有效试验的先决条件。依此，本研究的结果在使用相同或不同材料后，不一定能够重现。由于技术上的问题和变化过多，微渗漏的研究结果很可能只是不可重复的随机结果。

总之，示踪剂可能并不适合充填体边缘封闭性的体外研究，因为示踪剂的分子太小，以至于能沿着牙本质／充填体界面上不可视的极微小途径渗透进入。因此，目前所有的研究即使在最佳的实验室条件下都无法观察到牙本质界面的完好边缘封闭。没有任何操作技术或粘接系统在牙本质界面上是100%有效的。在一项比较研究中，裂隙宽度和示踪剂渗透并没有相关性。有些研究人员推荐用细菌代替示踪剂，因为这样能更好的模拟临床环境。但这些试验十分复杂，因此并没有得到推广，试验方法也未被确证。

人们自然的会提出了一个合理的问题，为什么一项缺乏科学证据的试验方法会成为标准的研究手段？在一项对V类洞充填体进行体外边界质量评价和预期临床试验结果间相关性的研究中，不连续边缘的出现率与充填体边缘着色、继发龋和边缘裂隙的发生率并没有相关性。到目前为止，尚无可行的评价系统能使体外微渗漏试验与临床结果相匹配。相反，却有证据提示，术后敏感和继发龋可能与微渗漏都无关系。

结论

示踪剂渗透的深度可能与发生在牙本质边缘的裂隙有关，而与牙釉质边缘无关。尚需要包括裂隙宽度测量的更多系统研究来进一步阐释这一问题。