译文

种植体－基台微间隙及种植体圆度对细菌渗漏的影响：一项锥度连接种植体的体外实验

Association Between Implant–Abutment Microgap and Implant Circularity to Bacterial Leakage: An In Vitro Study Using Tapered Connection Implants

Eduardo Cláudio Lopes de Chaves e Mello Dias, Marcelo Sperandio, Marcelo Henrique Napimoga

原载　Int J of Oral & Maxillofacial Implant. 2018. 33(3): 505-511.（英文）

许彬欣　译　　张新春　审

摘　要

目的：本实验旨在探究锥度连接种植系统中，种植体与基台之间的微间隙及种植体平台圆度与细菌微渗漏的关系。**材料和方法：**检测了 4 个品牌的锥度连接种植体。细菌渗漏的检测以 0.3 μm 大肠杆菌悬液接种于种植体螺纹间空隙，于 37℃ 下培养 14d。将所有用于微生物学检测的样本纵向切割，并用扫描电镜（最大放大倍数 5000×）在两侧的 3 个位点测量微间隙大小。用显微影像学技术测量种植体平台圆度以量化显微镜下所见。**结果：**Nobel Biocare 系统中 2 个样本、Ankylos(Dentsply) 系统中 4 个样本、Neodent(Straumann) 系统中有 4 个样本及 Conexao 系统中 5 个样本细菌检测为阳性，且各系统细菌渗漏情况无显著差异。Neodent 系统的平均微间隙值最大（5.84±9.83 μm），其次是 Nobel Biocare 系统（5.17±4.10 μm），Ankylos 系统（3.47±3.28 μm），最后是 Conexao 系统（2.72±3.19 μm），各系统间无显著差异。所有系统均在显微影像检测中显示出圆度构造误差。**结论：**本实验检测的锥度连接种植系统均未能阻止细菌渗漏，并且未能避免构造误差。

关键词　细菌渗漏；种植体－基台交界面；骨结合

译者单位　中山大学光华口腔医学院
广东省广州市越秀区中山二路 74 号　510000

1　引言

不少纵向研究表明口腔种植体有高的远期成功率，但是仍有妨碍远期成功的因素存在，如种植体和基台的密合程度。

种植体－基台交界面(Implant–abutment interface，IAI)的间隙易引起细菌生物膜的积累，从而可能导致种植体周围组织的炎症反应。许多体外和体内实验证明细菌渗漏与不同平台的IAI有关。IAI上积累的细菌生物膜会影响种植治疗的效果，和种植体远期的美观及功能。很多种类的微生物，无论是革兰阳性球菌还是革兰阴性杆菌，都可以通过Brånemark 种植系统(Nobel Biocare公司)的零件间隙，如星座链球菌、类杆菌、消化链球菌和梭菌属。IAI上微生物的存在可导致周围组织的有害炎症反应。

Jansen及其同事做过一个经典实验，他们选用了13个种植系统评估不同类型的IAI与细菌渗漏的关系，并探究影响细菌渗漏的其他重要因素。除了1个系统，其余所有种植系统都至少有一个样本在培养的第一天就检测到了大肠杆菌的存在。

IAI上生物膜的积累可能导致骨丧失，因此细菌渗漏是种植研究中首要考虑的因素，尤其在设计或引入新型的种植体连接方式的时候。基于此，本实验的目的是评估4种锥度连接种植系统的IAI的细菌渗漏情况，并评估细菌渗漏与种植体－基台微间隙及种植体平台可能存在的构造误差之间的关系。

2　材料与方法

2.1　样本选择

本实验所用的种植体和其相应基台购买自巴西市场流通的4种种植系统。所有零件均从各公司的医药代表处购入，且他们对本实验不知情。所用的种植系统如表1所示。

2.2　微生物学检测

IAI上的细菌渗漏以前述方法来评估。

每个种植系统选用12个样本：其中10个为实验组，1个为阳性对照，1个为阴性对照。在使用前种植体及基台均存放在原有的无菌包装袋中，而Nobel Biocare系统和Ankylos(Dentsply)系统的制造商无灭菌操作，此二者在使用前24h以121℃、1.0KgF/cm2高压蒸汽灭菌22min(仪器为Cristó foli Lister 12L，Cristó foli)。所有微生物相关操作均在无菌层流净化罩内进行。使用微量吸管77FAA10(Prolab)吸取0.3μL大肠杆菌悬液(ATCC，编码25922)接种于实验组样本内部空隙区。实验所用大肠杆菌用冰冻脑心浸出液(BHI；Kasvi)在37℃下培养获得。

表1　测试样本的规格

系统	种植模型	基台	扭矩(Ncm)
Nobel Biocare	Replace CC 3.5×11.5mm (编号：36701)	15039	32
Ankylos	A11 (编号：3101 0410)	3102 1060	25
Neodent	Drive CM 3.5×11.5mm (编号：140.693)	114.077	32
Conexão	Flash 3.5×11.5mm (编号：52731199)	183103	20

随后，以制造商推荐的扭力、应用配套的螺丝钉与扳手(表1)，将基台与其对应种植体相连接。在细菌接种及应用扭力时，样本用已高压蒸汽灭菌的台钳来稳定。

应用扭力后，用一浸入无菌生理盐水的小刷子(KG Sorensen)涂抹种植体平台以检查之前的操作是否有微生物污染或接种液外溢。将无菌塑料尖嵌入基台周围使种植体－基台保存直立。随后将实验组样本及对应的小刷子分别置于含BHI液的无菌管内。实验组样本的无菌管内，BHI液没过IAI上方1mm。

每一个种植系统采用1个阳性对照及1个阴性对照。阳性对照组的种植体在不连接基台的情况下，接种0.3μL大肠杆菌悬液后置于含BHI液的无菌管。阴性对照组的种植体则在连接基台后不接种细菌。

将含实验组样本、实验组对应的小刷子、阳性对照以及阴性对照组的无菌管置于37℃下孵育(仪器：Q–316M2，Quimis Scientific Instruments)。分别在接种后第24h、48h、72h、5d、7d及14d时检测是否存在细菌。如果培养基呈现肉眼可见的浑浊则该样本为阳性，仍为透明溶液则视为阴性。

每个阳性样本要将其培养基接种于含有琼脂/BHI的皮氏培养皿中来确认是否有大肠杆菌的生长。此外，还要进行革兰染色并在光镜下却是否有革兰阴性杆菌的存在。

2.3　种植体－基台交界面微间隙的测量

用于检测微间隙的 10 个样本与微生物学检测的样本相同且检测顺序一致，阳性及阴性对照不参与检测。比如，用于细菌渗漏检测的样本 1 在间隙测量同样是样本 1。种植体－基台样本先高压蒸汽灭菌再以显微镜观察。

扫描电镜观察前的样品准备：将种植体－基台样本分别用环氧树脂 (Epofix，Struers A/S) 包埋后用精细的金属锯 (ISOMET 100-Buehler) 将包埋后的样品竖直切为两半，一半用于检测而剩下一半留作备用。将样本置于蒸馏水中用超声清洗 (Kondortech)5min，随后干燥、涂金涂层 (Emitech Sputter Coater K550，Emitech) 使之具有电子导电性，适于扫描电镜检测 (SEM)。

将样本用位于 COPPE-UFRJ 实验室的扫描电镜 (JEOL JSM-6460LV) 进行扫描，扫描电压为 20kV。

检测以下 3 个区域的微间隙宽度：基台与种植体连接的地方，也就是种植体与基台间隙中最近牙冠的部分 (区域 1)；IAI 内根方 400 μm(区域 2)；IAI 内根方 800 μm(区域 3)。为获得更精确的测量结果，所用的最大放大倍数为 5000×(图 1)。

2.4　显微影像技术分析构造误差

为评估可能存在的构造误差是否能导致 IAI 微间隙的产生，在恒定温度 (21℃ ±1℃) 下用 CT 扫描 (Metrotom 型号 800，序列号 158780，Zeiss) 进行圆度检测。圆度误差定义为：在最小外接圆的与最大内切圆之间的影像距离，包含垂直于旋转轴平面上的种植体表面。在此步骤中检测的是各个种植系统中 2 个全新且未连接基台的种植体。每个种植体观察以下两方面：（1）种植体壁近牙冠处的厚度，亦相当于测量种植体平台的肩台宽度；（2）测量基台接触区域的 3 个层面的圆度，分别位于冠方 1/3、中 1/3 及根方 1/3(图 2)。

2.5　数据分析

微生物学相关的数据为 BHI 试剂的浑浊度及细菌在接种后培养的生长情况，用 G 检验来分析每个孵育时间点的实验组与对照组数据是否有显著差异。

为比较各种植系统的 IAI 密合性，在 IAI 全长的 6 个位点测量微间隙长度并取平均值，用 K-W 检验来比较。同样用 K-W 检验来分析微间隙的最大值有无显著差异。

用 K-W 检验来分析样本的平均圆度及种植体

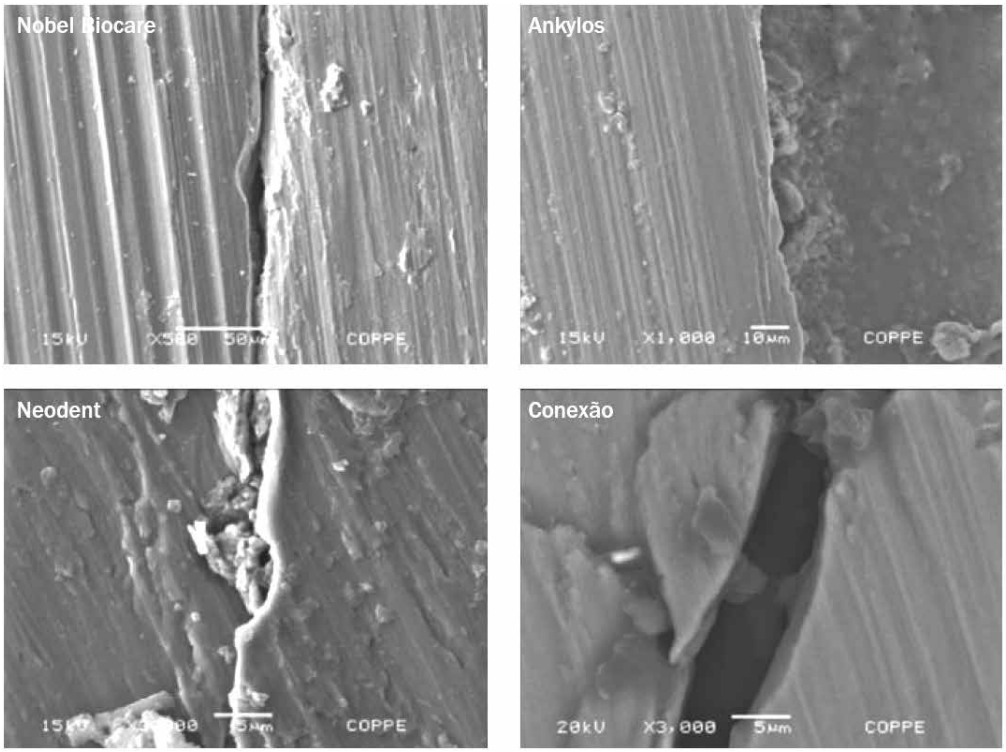

图 1　各种植系统中显示 IAI 不密合间隙的代表性 SEM 图像

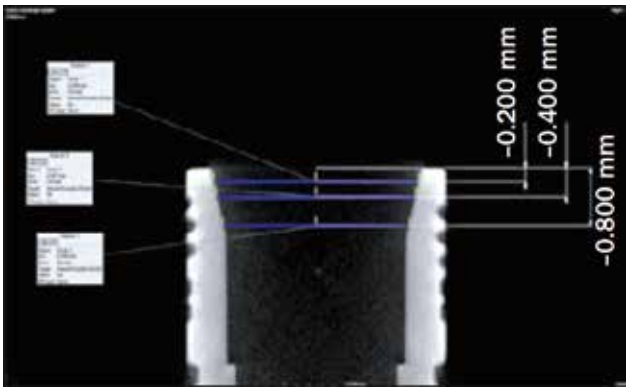

图 2　纵向切割后基台上用于测量圆度的 3 个不同高度位点的示意图（Conexao 系统）

壁厚度是否有显著差异。

以 $P > 0.05$ 为显著差异，所有数据分析应用 SPSS 23(SPSS) 软件及 BioEstat 5.0 软件 (Mamirau á Foundation) 完成。

3　结果

每个种植系统中共 10 个样本参与检测细菌渗漏，其中 Nobel Biocare 系统的 1 个、Ankylos 系统的 4 个、Neodent 系统的 5 个、Conexao 系统的 2 个样本检测到细菌污染。污染可能来自细菌接种的不当或应用扭力时细菌外溢，致用于检测细菌污染的小刷子培养基变浑浊。被污染的样本相应数据被剔除，则余下 Nobel Biocare 9 个、Ankylos 6 个、Neodent 5 个、Conexao 8 个样本（表 2）。

Nobel Biocare 系统中有 2 个样本检测到浑浊 (22.2%)，其中 1 个样本在接种后 72h 即检测到阳性，其余在 14d 为阳性。Ankylos 系统中 4 个样本检测到浑浊 (66.9%)，其中 1 个样本在接种后 72h 即检测到阳性，2 个在 7d 为阳性，其余在

表 2　基于种植体 – 基台组合及接种后时间的培养皿浑浊率

时间	系统	浑浊率		参检样本数
		浑浊	无浑浊	
24h	Nobel Biocare	0 (0.0)	9 (100.0)	9 (100.0)
	Ankylos	0 (0.0)	6 (100.0)	6 (100.0)
	Neodent	0 (0.0)	5 (100.0)	5 (100.0)
	Conexão	0 (0.0)	8 (100.0)	8 (100.0)
	G 检验	$P > .999$		
48h	Nobel Biocare	0 (0.0)	9 (100.0)	9 (100.0)
	Ankylos	0 (0.0)	6 (100.0)	6 (100.0)
	Neodent	0 (0.0)	5 (100.0)	5 (100.0)
	Conexão	0 (0.0)	8 (100.0)	8 (100.0)
	G 检验	$P > .999$		
72h	Nobel Biocare	1 (11.1)	8 (88.9)	9 (100.0)
	Ankylos	1 (16.7)	5 (83.3)	6 (100.0)
	Neodent	2 (40.0)	3 (60.0)	5 (100.0)
	Conexão	2 (25.0)	6 (75.0)	8 (100.0)
	G 检验	$P > .641$		
7d	Nobel Biocare	1 (11.1)	8 (88.9)	9 (100.0)
	Ankylos	3 (50.0)	3 (50.0)	6 (100.0)
	Neodent	2 (40.0)	3 (60.0)	5 (100.0)
	Conexão	4 (50.0)	4 (50.0)	8 (100.0)
	G 检验	$P=.253$		
14d	Nobel Biocare	2 (22.2)	7 (77.8)	9 (100.0)
	Ankylos	4 (66.9)	2 (33.3)	6 (100.0)
	Neodent	4 (80.0)	1 (20.0)	5 (100.0)
	Conexão	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (100.0)
	G 检验	$P=.116$		

14d 检测为阳性。Neodent 系统中有 4 个样本检测到浑浊 (80.0%)，其中 1 个样本在接种后 72h 即检测到阳性，其余 3 个在 14d 之后为阳性。最后是 Conexao 系统，5 个样本检测到浑浊 (62.5%)，其中 2 个样本在接种后 72h，2 个在 7d，其余在 14d 检测为阳性。G 检验显示各系统细菌渗漏情况无显著差异。但是，Nobel Biocare 系统的种植体在接种后 14d 的呈现较低的细菌渗漏趋势。

比较各系统 IAI 不密合性 (微间隙) 的平均值与最大值，用 K−W 检验未见 4 个系统组间有显著差异 (图 3，图 4)。

至于构造误差，所有系统均检测出圆度误差，表现为同系统内样本的种植体壁厚度差。而此差异各系统一致出现，经 K−W 检验未见各系统之间的显著差异 (表 3)。

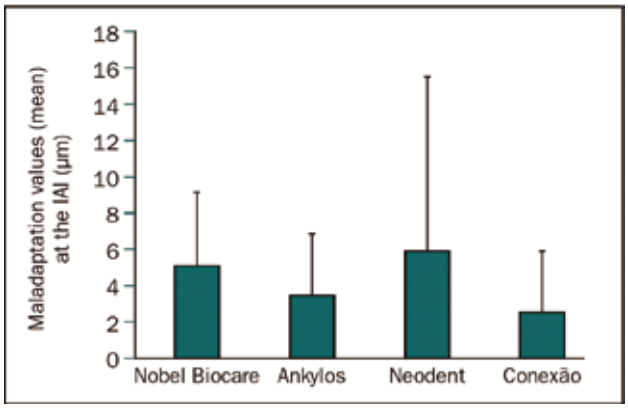

图 3　柱状图示 4 个种植系统的种植体 − 基台交界面不密合性（间隙）平均值及标准差

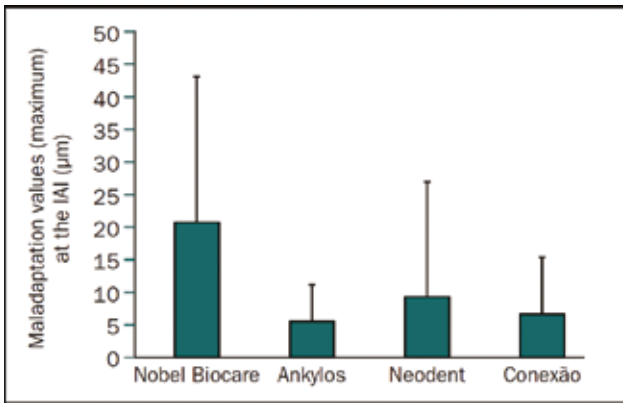

图 4　柱状图示 4 个种植系统的种植体 − 基台交界面不密合性（间隙）最大值及标准差

表 3　参检系统的圆度误差及种植体壁厚度差

系统	圆度误差	壁厚度差 (μm)
Nobel Biocare	0.009 (0.002)	0.31(0.01)
Ankylos	0.008 (0.001)	0.52(0.00)
Neodent	0.024 (0.023)	0.49(0.00)
Conexão	0.007 (0.001)	0.32(0.02)
K−W 检验	P=0.434	P=0.104

括号内为标准差。

4　讨论

口腔种植体的远期成功有赖于种植零件与口腔组织的稳定结合。种植体周骨丧失会在种植体行使功能的第一年出现，但行使功能对骨丧失的影响要次于手术创伤、过度咬合负重、种植体周围炎、生物学宽度的再形成，以及 IAI 上产生的微间隙。

IAI 上的细菌定植可致种植体周围组织的炎症反应，继而导致骨丧失。研究发现，在两阶段种植体 IAI 周围的结缔组织中有炎症的浸润，说明在 IAI 这个界面或邻近区域产生了趋化因子，可以启动募集炎症细胞的程序并维持炎症反应。

不少实验探究 IAI 上的细菌渗漏与修复体的连接方式是否有关。一些研究发现在锥度连接系统中 IAI 上的细菌渗漏极少甚至没有，但另一些研究表明锥度连接总体来说不能阻止细菌渗漏。而在本实验中，锥度连接体未能防止 IAI 上的细菌渗漏，因为所有参与检测的系统均至少有 1 个样本细菌检测阳性，且各系统之间无统计学差异。

前人已有文献说明种植体与基台的微间隙是不可避免的。本实验中观察到的所有样本的平均微间隙值均 > 2 μm，其中最大的可达 50 μm，但是各系统之间未见统计学差异。该值大于本实验所用细菌大小，细菌直径在 1.1 ~ 1.5 μm 之间，长度则是 2 ~ 6 μm，因此我们已经预计多数样本会出现细菌渗漏。但是，本实验无法证明微间隙宽度与细菌渗漏阳性率的直接关系。虽然很多文献已经探究并证实二者存在关系，但仍然无法量化。本实验有意识的将微生物学检测与显微镜检使用相同顺序，这在所有相关实验中为首次。

种植体负重时出现微动，因而易造成 IAI 上细菌渗漏，最终易导致骨丧失。Hermann 等人用不同间隙大小的基台来研究微间隙宽度对种植体周牙槽嵴骨改变的影响，该实验发现骨变化主要和种植体与基台间的微动相关，而与间隙大小无关。

Romanos 等人亦发现在负重状态下，平台对接与 Morse 锥度连接体的细菌种类不同，对牙槽骨丧失的影响不同；有人可能会争论说该实验将所有种植体用同一固定修复体连为一体，无论采用哪种连接体微动都会减小，因此增加了实验误差。而本实验并未评估负重对细菌渗漏的影响，因为目前关于如咀嚼时出现的循环性负重对种植体－基台适配性及 IAI 上可能产生的细菌渗漏的影响这一问题的研究并未达成共识。在一些实验中在循环性负重情况下细菌渗漏减少，但亦有研究发现增加，甚至未发现统计学差异。

基台与种植体微间隙的定量分析中，我们检测了各个种植系统所有样本的很多变量，并且这些变量的离差较大，见图 3、图 4。定性分析来看，我们用显微镜观察 IAI 的微间隙发现，即使在切开的样本中一侧未发现构造误差，另一侧则会出现显著的不密合。如果用圆度来解释，应用扭力时，种植基台可能被错放于圆柱形的种植体平台的一侧，则会在对侧形成可观的间隙。这一现象尽管与传统研究的发现不一致，但由此可以提出一个假设：显著的构造缺陷可能出现在种植体内部而不一定位于基台的接触面。这一假设有助于此后的实验中应用显微影像学的方法来评估种植体可能存在的构造误差。

需要说明的是我们未发现前人关于种植体圆度的研究，因此设计实验时遇到相当的困难，而最终我们选用显微影像学的方法来检测。实验中我们确实发现了构造误差，说明在将扭力作用于螺丝时，一侧种植体与基台形成紧密接触，从而减少甚至消除此区域的微间隙；但另一方面，另一侧则会形成明显间隙。根据此种构造误差位于种植体内壁的不同高度，间隙大小有明显差别。虽然这一解释言之有理，但这只是由每个种植系统 2 个样本得出的初级构想，因此需要设计更大样本量的实验来进一步证实。

也可能有人提出质疑说即使在 IAI 上存在微间隙和细菌渗漏，由于使用锥度连接系统使间隙和细菌都远离骨组织，换言之 IAI 更接近种植体中轴线，有平台转换效应，则能减少细菌生物膜的积累。考虑到平台转换器的大小可能会影响种植体周骨水平，当平台转换器≥ 0.4mm 时可致更佳的骨组织反应，因此应进一步研究锥度连接体种植体中不同型号平台转换器。本实验中用显微影像技术测量冠方锥度壁的厚度，结果显示 Ankylos 最厚 (0.52±0.00μm) ，其次是 Neodent (0.49±0.00μm)、Conexao(0.32±0.02μm)，Nobel Biocare 最薄 (0.31±0.01μm)。有趣的是，我们不仅发现在一个种植体竖直切片的两端厚度不一致，同系统的两个样本厚度也不一致，这一现象可能表明存在制造缺陷。但是由于样本量太少，此发现还需进一步研究。

5 结论

4 个种植系统均有证据表明存在 IAI 的不适配性、种植体内壁的构造误差及细菌渗漏。检测的锥度连接系统无法阻止细菌渗漏。接下来需要更多样本量更大的实验来研究种植体的构造误差对种植体－基台交界面上细菌渗漏的影响，尤其从临床角度来进行研究。

6 鸣谢

感谢来自 COPPE 的 Marcia Sader 博士协助我们使用 SEM，感谢巴西国家科技发展委员会 (CNPq) 的经济支持 (M.H.N. 由一科研团队拨款 #303555/2013-0,CNPq)，本文作者与相关方无利益冲突。