

# Realtime PCR법과 세균배양법을 이용한 치아우식세균 검사법 비교 연구

윤정희<sup>1</sup>, 박지현<sup>2</sup>, 조자원<sup>3</sup>, 김성원<sup>3</sup>

<sup>1</sup>단국대학교 보건복지대학원 구강보건학과, <sup>2</sup>강릉영동대학교 치위생과, <sup>3</sup>단국대학교 치과대학 예방치과

## Caries activity test by realtime PCR method and bacterial cultural method

Joung-Hee Yun<sup>1</sup>, Ji-Hyeon Park<sup>2</sup>, Ja-Won Cho<sup>3</sup>, Sung-Won Kim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Health, Graduate School of Public Health and Social Welfare, Dankook University, Cheonan,

<sup>2</sup>Department of Dental Hygiene, Gangneung Yeongdong University, Gangneung,

<sup>3</sup>Department of Preventive Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korea

**Received:** August 20, 2020  
**Revised:** September 11, 2020  
**Accepted:** September 11, 2020

**Corresponding Author:** Sung-Won Kim  
Department of Preventive Dentistry,  
College of Dentistry, Dankook University,  
119 Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan  
31116, Korea  
Tel: +82-41-550-1953  
Fax: +82-41-553-6582  
E-mail: kimsungwon.dankook@gmail.com  
https://orcid.org/0000-0001-8862-6363  
\*이 논문은 윤정희의 2016년 석사 학위 논문의  
일부를 발췌하였음.

**Objectives:** This study aimed to compare the results of conventional methodology and real-time polymerase chain reaction (PCR) for acid-producing bacteria and identify the appropriate method for caries activity testing.

**Methods:** Oral examination and caries activity tests, such as the CRT<sup>®</sup> Bacteria test and modified Snyder test, were conducted on 33 middle school students in Cheongju, South Korea. Pearson correlation analysis was subsequently performed with a significance level of 5%.

**Results:** The amount of *Streptococcus mutans* determined using the CRT<sup>®</sup> Bacteria test was highly correlated with the decayed teeth (DT) index ( $R=0.570$ ,  $P<0.05$ ); decayed, missing, and filled teeth (DMFT) index ( $R=0.376$ ,  $P<0.05$ ); and dental health capacity of the first permanent molar ( $R=-0.395$ ,  $P<0.05$ ). The amount of *Streptococcus mutans* determined using real-time PCR was significantly associated with the DT index ( $R=0.528$ ,  $P<0.05$ ), DMFT index ( $R=0.369$ ,  $P<0.05$ ), and dental health capacity of the first permanent molar ( $R=-0.426$ ,  $P=0.013$ ).

**Conclusions:** There was a significant correlation between the amount and the type of bacteria between the CRT<sup>®</sup> Bacteria test and real-time PCR; therefore, these tests were found to be more appropriate to determine caries activity than the modified Snyder test. This study suggests that real-time PCR is a better technique for detecting caries activities than conventional techniques, such as the CRT<sup>®</sup> Bacteria test and modified Snyder test, because it is easy to use and provides accurate results.

**Key Words:** Caries activity test, Oral microorganism, *Streptococcus mutans*

## 서 론

구강내 치아우식증을 야기하는 요소로 구강내 환경과 미생물의 종류와 여부, 타액 분비량과 완충능 및 당분 함유 식품의 섭취 등을 들 수 있다. 이들은 매우 복잡한 요소가 상호작용하여야 하며, 이러한 요인들을 크게 숙주 요인과 환경 요인 및 병원체 요인으로 구분하고, 이 세

가지의 질병 발생요인이 함께 작용함으로써 치아우식증이 발생되는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

그러나 여러 가지 원인 요소들이 균일하게 작용한다고 하더라도 각 개인의 특성에 따라 치아우식증이 발생되거나 발생되지 않을 수도 있다. 이처럼 복잡한 양상을 띠고 있는 개인별 구강 발생요인을 가능한 대로 찾아내며, 각 개인의 특성을 고려하여 효율적으로 치아우식증

의 발생을 예방하고자 하는 일련의 검사과정을 치아우식 활성 검사라고 한다<sup>2-5)</sup>.

지난 수년간 치아우식 활성검사를 활용한 우식발생 여부를 예측하고자 하는 노력이 꾸준히 진행되어 왔으며<sup>6)</sup>, 많은 연구들이 이루어져 왔다. 그중 타액과 치태에 관한 세균의 연구는 활발히 이루어져 왔고, 타액 내에 존재하는 산생성균들이 치아우식 발생과 상관관계가 있음을 나타내는 연구들이 보고된 바 있고<sup>1)</sup>, 대표적인 산생성균에는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* 등이 있다. 치아우식 활성검사에서 주요 항목 중 하나는 이러한 산생성균의 양을 측정하는 것이 포함되어 있다. 이러한 구강내 산생성균을 검사하는 방법에는 스나이더 검사, cariostat 검사, cariescreen SM 검사, Dentocult SM 검사법이 상용화되어 사용되고 있다<sup>2)</sup>. 최근에는 Realtime PCR법을 이용한 구강내 세균들의 종류 및 그에 따른 세균들을 정량화 하는 방법이 개발되어 사용되기 시작하였다<sup>7,8)</sup>.

이번 연구는 기존의 세균배양을 기본으로 하는 산생성균 검사법과 Realtime PCR 법을 이용한 구강내 세균검사법을 비교하여 구강내 산생성균 검사의 기초자료로 이용하고자 하며, 기존 방법보다 간편하고 정확한 예측방법이 향후 구강내 환경관련 예방 및 치료 동의의 동기유발 자료로서 임상에서 환자의 활용여부를 알아보하고자 하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

이번 연구는 우식발생과 관련한 타액의 산생성균 요소 및 치아우식경험 등을 평가하기 위해 치아우식 발생률이 높은 연령대인 남자 중학교 학생 중 33명을 대상으로 하였으며(Table 1) D대학교 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)로부터 심의 승인을 받아 연구를 실시하였다(IRB: D\*\* 2016-07-026).

**Table 1.** Age distribution of the subjects

Age group	Age	Total
Middle school S.	12	15
	13	13
	14	5

## 2. 연구방법

### 2.1. 구강검사

치아우식경험도를 알아보기 위하여 구강내 환경을 사진으로 기록하고, 치경과 탐침을 이용하여 구강검사를 시행하였으며, 세계보건기구의 진단 기준에 따라 우식영구치(DT), 상실치아(MT), 우식충전영구치(FT)를 조사하였다<sup>9)</sup>.

제1대구치의 건강도를 평가하는 방법으로 건전 시 10점을 기준으로 우식 치면 1면당 1점씩 차감, 충전 치면은 0.5점씩 차감하여 제1대구치의 우식경험 치면에 관한 점수를 조사하였다<sup>9)</sup>.

### 2.2. 우식활성검사

타액 분비량 검사와 개량스나이더 검사를 통해 우식활성검사를 실시하였다. 먼저 자극성 타액 분비량을 측정하기 위하여 파라핀 왁스를 5분 동안 저작하게 하면서 분비된 타액을 소독한 컵에 빨게 하여 분비량을 무게로 측정하고 총량을 기록하였다<sup>10)</sup>.

타액 내에 있는 산생성균의 양과 활동성 정도를 비색법으로 측정하여 검사하였다(Fig. 1). 이때 소독된 면구로 구치부 협면 치면을 문질러 세균막 채취 후 면구를 배지에 넣고 막대를 부러뜨려 밀봉 후 배양기에 37℃에서 48시간 배양한 뒤 배지의 색상 변화를 기준표와 비교하여 판정하였다<sup>11)</sup>.

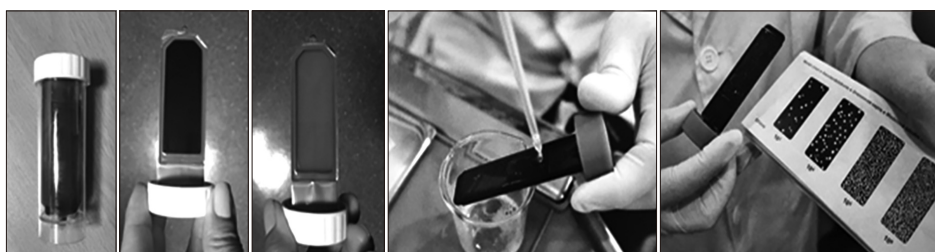
### 2.3. 구강미생물검사

*Streptococci mutans*군과 *Lactobacillus casei*군 검사를 양면의 배지를 이용하여 CRT bacteria 검사를 하였다(Fig. 2). 왁스를 저작해 자극성 타액을 모은 후 채집된 타액을 스포이트를 이용해 슬라이드 양면에 충분히 도포를 한 뒤 타블렛을 넣은 용기에 넣고 밀봉 후 온도 37℃ 배양기에서 48시간 배양하여 판정 사진 기준에 따라 1-4점으로 판정하였다(Fig. 2).

구강미생물의 종류와 양 분석을 위해서 realtime PCR법을 적용한



**Fig. 1.** Standardization of color changes for modified Snyder test.



**Fig. 2.** CRT® bacteria score reading.

Easyperio 검사를 하였다. Easyperio를 이용한 분석을 위해 약 30초 간 가글한 용액을 Easyperio전용 수거용기에 채득한 뒤, 분석기관을 통해 구강 미생물의 종류와 양의 데이터를 확보하였다.

### 3. 자료분석

Windows용 SPSS 한글판 23.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하여 치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 상관관계분석, 치아우식 경험도와 구강미생물양과의 상관관계, 구강미생물의 양과 우식활성요인과의 상관관계를 Pearson correlation으로 분석하였다. 이때 구강미생물 수치는 로그지수로 변환하여 통계처리 하였으며, 유의수준은 5%로 하였다.

**Table 2.** Pearson correlation between caries activity test and DMFT index

Index	Saliva (N=33)	Snyder (N=33)	CRT_SM (N=33)	CRT_LB (N=33)
DT	-.299	.159	.570*	.137
FT	-.063	.019	.030	.044
DMFT	-.233	.113	.376*	.118
Molar 6 <sup>†</sup>	.309	-.186	-.395*	-.146

DT, Decayed tooth; FT, Filled tooth; DMFT, Decayed, missing and filled teeth; CRT\_SM, CRT<sup>®</sup> bacteria score of *Streptococci mutans*; CRT\_LB, CRT<sup>®</sup> bacteria score of *Lactobacillus*.

\*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). <sup>†</sup>Molar 6: dental health capacity of the first permanent molar.

## 연구 성적

### 1. 치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 상관관계

치아우식 경험도와 우식활성 요인과의 Pearson의 상관관계분석 결과, CRT검사에서 *Streptococcus mutans*양과 DT ( $R=0.570$ ,  $P<0.05$ ), DMFT ( $R=0.376$ ,  $P<0.05$ ), 제1대구치건강도( $R=-0.395$ ,  $P<0.05$ )와 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다(Table 2).

### 2. 치아우식 경험도와 구강미생물양과의 상관관계

치아우식 경험도와 구강미생물양과의 상관관계분석 결과, Realtime PCR검사에서 *Streptococcus mutans*양과 DT ( $R=0.528$ ,  $P<0.05$ ), DMFT ( $R=0.369$ ,  $P<0.05$ ), 제1대구치건강도( $R=-0.426$ ,  $P<0.05$ )로 나타났고 *Streptococcus mutans*양 유병자의 로그 지수인 *Streptococcus mutans*로그지수 양과 DT ( $R=0.436$ ,  $P<0.05$ ) 높은 상관성이 있는 것으로 나타났다(Table 3).

### 3. 구강미생물양과 우식활성요인과의 상관관계

미생물 양을 로그지수로 변환 시켰을 때 *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*에서 연령에 따른 세균의 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다( $P<0.05$ , Table 4).

## 고 안

치아우식 활성검사가 갖추어야 할 필수 조건의 하나는 신뢰성이 다. 신뢰성은 검사의 결과에서 우연한 결과가 아니라는 확인을 줄 수 있어야 하며, 측정하는 방법이나 기구의 타당성이 필요하다<sup>12)</sup>. 이상적

**Table 3.** Pearson correlation between oral microbes and caries experience

(Unit: 10 logarithmic values)

Index	S.mi (N=33)	S.mu (N=33)	S.so (N=33)	L/B (N=33)	S.mi10 (N=33)	S.mu10 (N=27)	S.so10 (N=2)	L.B10 (N=2)
DT	0.326	0.528*	0.131	0.122	0.270	0.436*	1.000	-1.000
FT	-0.059	0.054	-0.195	0.113	-0.119	-0.005	-1.000	-1.000
DMFT	0.159	0.369*	-0.064	0.16	0.079	0.274	-1.000	-1.000
Molar 6 <sup>†</sup>	-0.151	-0.426*	0.134	-0.064	-0.067	-0.328	1.000	1.000

DT, Decayed tooth; FT, Filled tooth; DMFT, Decayed, missing and filled teeth; CRT\_SM, CRT<sup>®</sup> bacteria score of *Streptococci mutans*; CRT\_LB, CRT<sup>®</sup> bacteria score of *Lactobacillus*; S.mi, *Streptococcus mitis*; S.mu, *Streptococcus mutans*; S.so, *Streptococcus sobrius*; L/B, *Lactobacillus casei*; S.mi10, *Streptococcus mitis* logarithmic; S.mu10, *Streptococcus mutans* logarithmic; S.so10, *Streptococcus sobrius* logarithmic; L.B10, *Lactobacillus casei* logarithmic.

\*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). <sup>†</sup>Molar 6: Dental health capacity of the first permanent molar.

**Table 4.** Pearson correlation between the amount of oral microbes and caries activity

(Unit: 10 logarithmic values)

Index	S.mi (N=33)	S.mu (N=33)	S.so (N=33)	L/B (N=33)	S.mi10 (N=33)	S.mu10 (N=27)	S.so10 (N=2)	L.B10 (N=2)
Molar 6	-.151	-.426*	.134	-.064	-.067	-.328	1.000	1.000
Saliva	-.291	-.393*	.177	-.301	-.257	-.386*	1.000	-1.000
Snyder	.345*	.264	.276	.366*	.408*	.343	1.000	-
CRT_SM	.564*	.621*	.184	.132	.311	.565*	1.000	-1.000
CRT_LB	.495*	.247	.336	.260	.317	.193	-	-1.000

S.mi, *Streptococcus mitis*; S.mu, *Streptococcus mutans*; S.so, *Streptococcus sobrius*; L/B, *Lactobacillus casei*; S.mi10, *Streptococcus mitis* logarithmic; S.mu10, *Streptococcus mutans* logarithmic; S.so10, *Streptococcus sobrius* logarithmic; L.B10, *Lactobacillus casei* logarithmic.

\*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

인 치아우식활성 검사에서 갖춰야할 조건은 1951년 Snyder에 의해 제시되었고 최근에도 다양한 방법으로 검토되어 왔다<sup>2-4)</sup>. 하지만 일반 개인치과의원 등 임상에서 간편하게 사용되기 위해선 여러 가지 통제 변수 관리의 어려움과 우식활성검사의 복잡함 그리고 비용적인 측면에서 고가의 실험배지나, 위상차 현미경 등 고가의 장비가 필요한 경우가 많았다. 또한 실험 결과를 판단하는 치아우식검사의 기준표가 색상의 차이로 결정하거나 세균 분포를 3-5가지의 기준표로 판정하는 경우가 많았다. 이의 문제점으로 평가자가 주관적으로 판단하고 결과를 내는 모호함이 지적되어 왔다. 최근엔 위상차현미경을 통해 환자에게 모니터를 통해 구강내 세균을 보여줌으로써 동기유발의 한 자료로 채택되어 왔다. 구강세균의 양을 대략적으로 파악하고, 구강세균의 활동성으로 세균이 움직이는 거리를 측정하여 판별하고 시각적 자료로서 활용하였다<sup>13,14)</sup>. 이는 환자에게 칫솔질 전후의 세균의 양과 움직임 등을 전달하여 동기유발 자료로 좋은 방법이었다. 하지만 정확한 세균의 이름과 종류의 수는 아니었고, 그 움직임과 양을 대략적으로 판단하였으며, 장비를 구입할 때 고가의 초기 비용이 발생할 수 있었다.

개인의 구강건강지수 산정 및 구강건강 관리계획을 수립하고자 할 때, 임상에서 활용하고자 한다면, 기존 방법보다 간단한 검사 방법으로 환자의 불편함을 최소화하여야 하며, 비용도 합리적이어야 한다<sup>15)</sup>. 이러한 관점으로 접근한다면 환자의 구강내 치아우식균의 종류와 그 수를 정확히 파악할 수 있는 Realtime PCR방법을 활용하면, 환자에게 세균의 종류에 따른 투약이나 섭취습관의 조절을 유도 가능할 것으로 사료되었다.

실험 결과 CRT Bacteria검사 결과와 Realtime PCR의 유의성이 높았고, 치아우식 활성 세균검사를 시행할 때 개량스나이트검사보다는 CRT bacteria검사법을 활용하거나, Realtime PCR 활용하는 것이 바람직하다고 사료되었다. 하지만, 저자는 환자에게 CRT bacteria검사방법을 시행하면서 5분간 왁스를 저작해 자극성 타액을 모으고, 배지에 넣어 48시간 동안 배양을 하는 복잡함과 배지의 손상이나 정확한 배양 시간 등 통제변수의 어려움을 택하기 보다는, 30초의 가글로 간편하게 환자의 타액 내 세균을 채취하여 Realtime PCR검사를 통해 정량화된 구강내 세균 종류와 수를 파악하는 방법을 택하여 임상에서 환자의 치아우식의 구강미생물요인에 관한 예측방법을 활용하고 예방 및 치료 동의를 동기유발 자료로서 활용하는 것을 고려해야 한다고 사료된다.

## 결 론

저자는 기존의 산생성균 검사법들과 Realtime PCR 법을 이용한 구강내 세균검사법을 비교하여 구강내 산생성균 검사의 기초자료로 이용하고자, 구강검사 및 기타 치아우식활성검사를 시행하고 Realtime PCR검사를 시행한 결과 CRT Bacteria검사 결과와 Realtime PCR검사의 결과값은 세균의 종류와 양에 관하여 높은 상관관계를 나타내어 우식활성 세균검사에 적합한 것으로 나타났고, 우식 활성 세균검사를 시행할 경우 스나이트검사보다는 CRT bacteria검사법이나

Realtime PCR을 활용하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

또한 임상적으로 기존 방법보다 간편하고 정확한 예측 방법을 활용하고자 하는 경우, Realtime PCR 검사법을 활용함으로써 예방 및 동기 유발에 도움을 줄 것으로 사료된다.

## ORCID

Joung-Hee Yun, <https://orcid.org/0000-0001-6146-0981>

Ji-Hyeon Park, <https://orcid.org/0000-0001-7692-6377>

Ja-Won Cho, <https://orcid.org/0000-0003-1458-0416>

## References

1. Paik DI, Kim HD, Shin SC, Cho JW, Park YD, Kim DK, et al. Clinical preventive dentistry. 5th ed. Seoul:Koomoonso;2011:23-41,265-287.
2. Ali YA, Chandranee NJ, Wadher BJ, Khan A, Khan ZH. Relationship between caries status, colony forming units (cfu) of Streptococcus mutans and Snyder caries activity test. J Indian Soc Pedod Prev Dent 1998;16:56-60.
3. Ramesh K, Kunjappan S, Ramesh M, Shankar S, Reddy S. Comparative evaluation of predictive value of three caries activity tests-snyder, lactobacillus count and cariostat in mixed dentition children with and without caries. J Pharm Bioallied Sci 2013;5(Suppl 1):S63-68.
4. Sims W. A modified Snyder test for caries-activity in humans. Arch Oral Biol 1968;13:853-856.
5. Darwita RR, Andreas P. Salivary parameters of buffer capacity, pH saliva and pH plaque related to dental caries activity in school student. Int J Clin Prev Dent 2013;9:145-148.
6. Kim JG, Kim YS, Baik BJ, Yang YM. Relationship between salivary caries-related tests and dental caries experience in Korean dental college students. J Korean Acad Pediatr Dent 2005;32:67-74.
7. Jeon YM, Moon KH, Cho JW. Prevalence of oral microbes known to be the cause of in patients of 20s with early gingivitis. Int J Clin Prev Dent 2015;11:97-100.
8. Jeon YM, Cho JW, Lee JY, Woo SH. The effects of oral microorganism on oral malodor. Int J Clin Prev Dent 2015;11:171-176.
9. Kim JB, Choi EG, Moon HS, Kim JB, Kim DK, Lee HS, et al. Public health dentistry. 4th ed. Seoul:Koomoonso;2004:303-378.
10. Lee JW, Kim MS, Choi YH, Chang YS, Shin SC. A study on the relation of the stimulated salivary flow rate, pH and the viscosity. Int J Clin Prev Dent 2008;4:112-122.
11. Kim JB, Choi EG, Paik DI, Shin SC, Chang KW, Hong SJ, et al. Preventive dentistry. 5th ed. Seoul:Koomoonso;2008:301-318.
12. Shin DK, Kim JY, Song KB, Nam SH. Relationship between Dento-cult-SM test, microbial analysis and dental caries in the pre-school children. J Korean Acad Pediatr Dent 2003;30:254-262.
13. Chang YS, Jung MA, Shin SC. Evaluation of motility and distribution of oral micro-flora in Korean using the phase contrast microscope. Int J Clin Prev Dent 2008;4:28-39.
14. Jung KY, Chang YS, Lee YJ, Woo SH. Correlation coefficient between the amount and the motile of various oral microorganism. Int J Clin Prev Dent 2008;4:168-176.
15. Kim DH, Park JH, Yun MH, Shin SC, Cho JW. The differential weight of factors for estimation of individual oral health index. Int J Clin Prev Dent 2014;10:37-43.