

Đánh giá sự biến động hệ vi sinh vật trong điều trị nội nha răng viêm quanh chóp mạn tính bằng giải trình tự thế hệ mới 16S rDNA metagenomics

The alteration of the microbiology in endodontic treatment of periapical periodontitis using next generation sequencing 16S rDNA metagenomics

Dương Thị Phương Linh*,
Nguyễn Vũ Trung**,
Nguyễn Hữu An***

**Bệnh viện Răng Hàm Mặt Trung ương Hà Nội,*
***Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh,*
****Viện Công nghệ Phacogen*

Tóm tắt

Mục tiêu: Mô tả thành phần và biến động hệ vi sinh vật (VSV) trong răng viêm quanh chóp mạn tính qua các giai đoạn điều trị nội nha. *Đối tượng và phương pháp:* Nghiên cứu theo chiều dọc trên 32 bệnh nhân có răng viêm quanh chóp mạn tính đến khám tại Bệnh viện Răng Hàm Mặt Trung ương Hà Nội từ tháng 4/2020 đến tháng 4/2024, được chia làm 2 nhóm: Nhóm I bơm rửa ống tuỷ bằng chlohexidine (CHX) 2% kết hợp natri hypochlorit (NaOCl) 3%; nhóm II bơm rửa ống tuỷ bằng NaOCl 3%. Lấy mẫu VSV trong lòng ống tuỷ răng, nghiên cứu 3 lần: Trước bơm rửa (S1), sau bơm rửa (S2), sau đặt thuốc 2 tuần (S3). *Kết quả:* Trong 96 mẫu nghiên cứu metagenomics: Có 27 ngành, 467 chi vi sinh vật. Các chi vi sinh vật trội có xu hướng giảm dần ở 2 nhóm trong đó nhóm I có mức độ giảm các chi trội này cao hơn ở nhóm II. *Kết luận:* Quá trình bơm rửa ống tuỷ có sử dụng dung dịch sát khuẩn CHX có thể loại bỏ vi sinh vật trên diện rộng, và làm thay đổi tỷ lệ vi sinh vật trong quần thể nhiều hơn khi không sử dụng dung dịch CHX.

Từ khoá: Metagenomics, bơm rửa ống tuỷ.

Summary

Objective: To describe the composition and fluctuations of the microbiota in root canal of teeth with periapical periodontitis through stages of endodontic treatment. *Subject and method:* Longitudinal study on 32 teeth of patients examined at Hanoi National Hospital of Odonto-Stomatology from April 2020 to April 2021. Patients have teeth with periapical periodontitis were divided into 2 groups: Group I were irrigated into root canal by chlohexidine (CHX) 2% combined with sodium hypochlorite (NaOCl) 3%; group II were irrigated into root canal by 3% NaOCl. Take samples in root canal in 3 times: Before irrigation (S1), after irrigation (S2), and 2 weeks after place the medicine in root canal (S3). *Result:* There were 27 phyla and 467 genera of microorganisms in 96 samples. The dominant microbial genera tended to gradually decrease in 2 groups, in which group I had a higher level of reduction of these dominant genera than in group II. *Conclusion:* Using NaOCl disinfectant solution combined with CHX can eliminate microorganisms on a large scale, and change the proportion of microorganisms in the population more than NaOCl.

Ngày nhận bài: 19/4/2024, *ngày chấp nhận đăng:* 25/4/2024

Người phản hồi: Dương Thị Phương Linh, Email: duongphuonglinh282@gmail.com - Bệnh viện Răng Hàm Mặt TW

Keywords: Metagenomics, root canal irrigation.

1. Đặt vấn đề

Viêm quanh chóp răng mạn tính là một bệnh lý phổ biến trong nha khoa, có nguyên nhân chính từ vi khuẩn. Theo Tiburcio-Machado CS và cộng sự [1], khoảng 52% dân số thế giới có ít nhất một răng viêm quanh chóp mạn tính. Các chất sát khuẩn hầu hết chỉ có thể ảnh hưởng tới một phần quần thể vi sinh vật [2], [3], [4]. Vì vậy, để nâng cao hiệu quả điều trị, cần tìm ra thành phần của cộng đồng vi sinh vật liên quan đến viêm quanh chóp mạn tính, từ đó làm sáng tỏ “yếu tố gây bệnh” trong những răng bệnh lý so với điều kiện bình thường. Vi sinh vật trong ống tuỷ răng viêm quanh chóp mạn tính phần lớn là kỵ khí. Các nghiên cứu thông qua các phương pháp nuôi cấy, sinh hóa trên phạm vi rộng có nguy cơ thiếu các loài chủ chốt [5], [6]. Việc áp dụng các phân tích đa dạng vi khuẩn dựa trên 16S rDNA cho phép phát hiện một cộng đồng vi khuẩn quy mô lớn trong các bệnh nhiễm trùng nội nha, bao gồm các vi khuẩn không thể nuôi cấy và thậm chí các loài có độ phong phú thấp [7]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “Đánh giá biến động hệ vi sinh vật trong điều trị nội nha răng viêm quanh chóp mạn tính bằng công nghệ giải trình tự thế hệ mới 16s rDNA metagenomics” với mục tiêu: *Mô tả thành phần hệ vi sinh vật và biến động hệ vi sinh vật trong răng viêm quanh chóp mạn tính qua các giai đoạn điều trị.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Những bệnh nhân có viêm quanh chóp mạn tính ở nhóm răng cửa và răng hàm nhỏ đến khám và điều trị tại Bệnh viện Răng Hàm Mặt Trung ương Hà Nội, từ tháng 4/2020 đến tháng 4/2024.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân độ tuổi từ 14-65 tuổi, ở cả 2 giới nam và nữ có răng cửa và răng hàm nhỏ có 1 chân răng được chẩn đoán viêm quanh chóp mạn tính, đường kính tổn thương vùng chóp trên X-quang < 10mm.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân mắc một trong các bệnh toàn thân nặng. Những răng bị nứt vỡ. Răng bị viêm quanh răng ở giai đoạn cuối.

2.2. Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu theo chiều dọc.

Chọn mẫu: Cách chọn cỡ mẫu thuận tiện, n=32.

Cách tiến hành: Các bệnh nhân được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm 16 bệnh nhân (16 răng).

Nhóm I (sử dụng CHX): Bơm rửa ống tuỷ bằng dung dịch NaOCl 3% kết hợp với CHX 2%, sau đó đặt thuốc canxi hydroxit 2 tuần.

Nhóm II (Không sử dụng CHX): Bơm rửa ống tuỷ bằng NaOCl 3%, sau đó đặt thuốc canxi hydroxit 2 tuần.

Lấy mẫu trong ống tuỷ răng ở 3 thời điểm: Trước bơm rửa (S1), sau bơm rửa (S2), sau đặt thuốc 2 tuần (S3). Bệnh nhân sau đó được điều trị nội nha để bảo tồn răng.

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết từ mẫu phân của các bệnh nhân bằng bộ kit DNeasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các mẫu DNA sau tách chiết được kiểm tra chất lượng bằng đo nanodrop, PCR 16S. Sau đó các mẫu này được lưu ở -20 độ C nhằm phục vụ cho các công đoạn tiếp theo.

Giải trình tự amplicon 16S rDNA và tiền xử lý dữ liệu đầu ra: Các mẫu DNA tổng số được giải trình tự vùng V4 bằng công nghệ giải trình tự đoạn ngắn của Illumina (Illumina miseq). Dữ liệu sau giải trình tự được đọc điểm qscore bằng công cụ FastQC, MultiQC [8, 9]. Công cụ DADA2 chạy trên nền tảng QIIME2 được sử dụng để ghép nối các trình tự ngược - xuôi, khử nhiễu và khởi tạo các ASVs V4 hoàn chỉnh, cắt bỏ barcodes và linkerprimer [10, 11].

Phân tích sự đa dạng hệ vi sinh vật: Sự đa dạng hệ vi sinh vật của các nhóm thí nghiệm được phân tích theo các chỉ tiêu alpha diversity (Faith Phylogenetic - faithpd, Chao1, Observed Feature, Pielou Evenness).

Định danh và phân tích thành phần hệ vi sinh vật: SILVA database [12, 13] được xử lý qua chu trình

RESCRIPT được mô tả trong hướng dẫn của QIIME2. Nhằm tạo bộ dữ liệu tham chiếu chứa trình tự vùng V4 của gen 16S rDNA [14]. Các ASVs được đối chiếu với bộ dữ liệu tham chiếu SILVA database 138 đã được xử lý.

Trực quan hóa dữ liệu và phân tích thống kê: Các dữ liệu thu thập được sau quá trình xử lý với các thuật toán trên QIIME2 được phân tích với các thuật toán thống kê trên R. So sánh trung bình tổng thể của cụm hoặc cặp thực hiện bằng kiểm định Kruskal Wallis, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Các kết quả sau đó được trực quan hóa trên Rstudio.

2.3. Đạo đức nghiên cứu

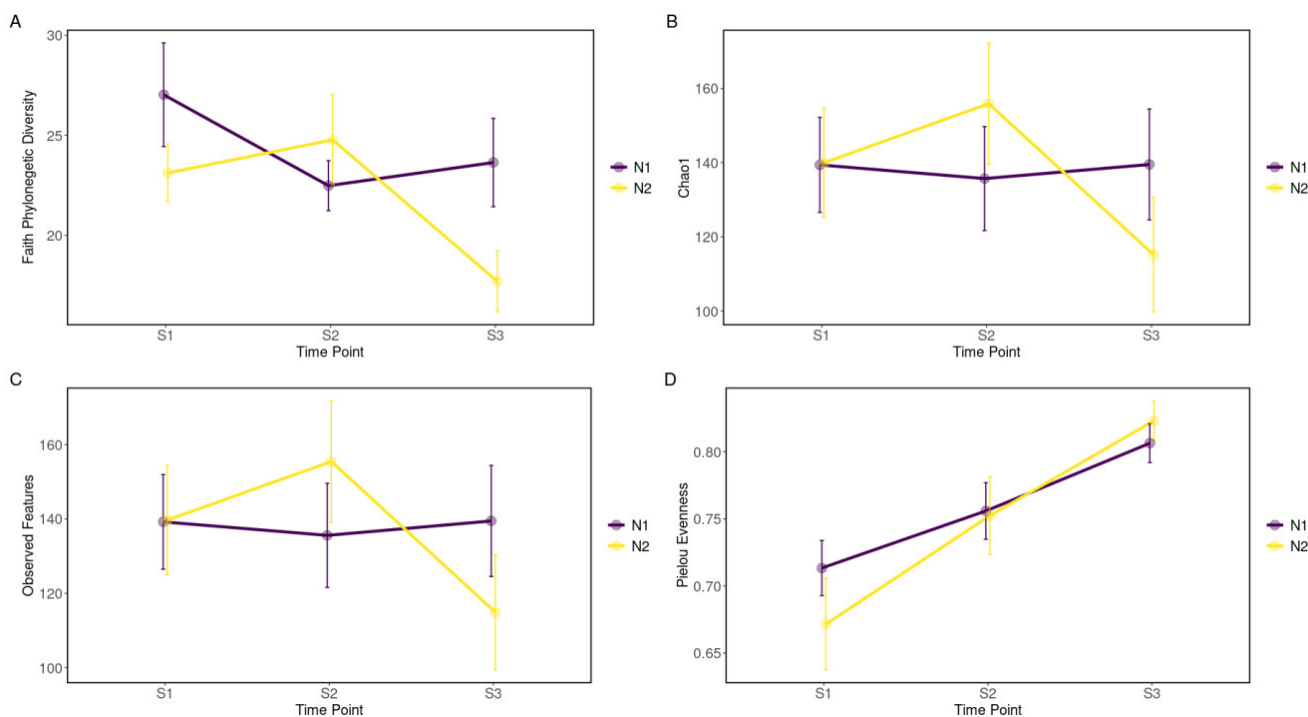
Tiến hành sau khi hội đồng khoa học thông qua và chấp thuận. Bệnh nhân và/hoặc người nhà bệnh nhân được thông báo và giải thích cặn kẽ về mục tiêu và nội dung nghiên cứu trước khi tự nguyện chấp nhận tham gia nghiên cứu. Trong quá trình nghiên cứu, bệnh nhân có quyền từ chối hoặc

không tham gia bất kỳ giai đoạn nào. Các thông tin của bệnh nhân đều được đảm bảo giữ bí mật.

3. Kết quả

Trong nghiên cứu, 32 bệnh nhân có 32 răng viêm quanh chóp mạn tính được phân bố như sau: Bệnh nhân nữ chiếm 56,25% cao hơn bệnh nhân nam (43,75%). Nhóm tuổi ≥ 45 chiếm tỷ lệ cao nhất là 59,37%. Tiếp theo là nhóm tuổi 25-44 là 34,38%. Thấp nhất là nhóm tuổi ≤ 24 , chỉ chiếm 6,25%. Không có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi của nam và nữ với $p > 0,05$.

Số lượng trình tự sau giải trình tự được có kích thước trung bình là 254bp (khớp với kích thước vùng V4 trên gene 16S vi khuẩn). Thu được tổng số 27 ngành và 467 chi trong 96 mẫu khảo sát trong đó có 10 ngành và 21 chi chiếm ưu thế. Các chỉ tiêu tính toán Faithpd, Chao1, Observed Features và Pielou Evenness được áp dụng để đo lường tính đa dạng và đồng đều trong quần thể VSV của 2 nhóm thử nghiệm I (N1) và II (N2) qua các thời điểm lấy mẫu khác nhau.



Hình 1. Sự đa dạng Alpha của các nhóm thử nghiệm theo các lần lấy mẫu

Tính đa dạng và đồng đều trong quần thể của nhóm I và nhóm II có sự tương đồng cao trong lần lấy mẫu S1. Tại S2 quần thể VSV của nhóm I có xu

hướng giảm mạnh (S1: 27->23,5), nhóm II có xu hướng tăng lên (23,5->25) (chỉ số Faithpd). Tại S3, quần thể VSV tại nhóm I không biến động nhiều,

trong khi tính đa dạng có xu hướng giảm nhanh tại nhóm I và II đều cho thấy xu hướng tăng mạnh về quần thể VSV của nhóm II (25->10). Cả 2 nhóm thử nghiệm I và II đều cho thấy xu hướng tăng mạnh về tính đồng đều trong quần thể VSV.

Bảng 1. Sự biến động tỉ lệ phần trăm (%) các ngành VSV ở 2 nhóm qua các lần lấy mẫu

STT	Chi vi sinh vật	Nhóm I			Nhóm II		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3
1	<i>Actinobacteriota</i>	10,74	12,01	12,18	7,29	11,33	20,58
2	<i>Bacteroidota</i>	23,93	8,14	17,30	19,29	9,84	5,51
3	<i>Campilobacterota</i>	3,38	0,50	0,30	3,23	1,12	0,66
4	<i>Chloroflexi</i>	0,99	0,88	0,49	1,10	0,26	0,45
5	<i>Desulfobacterota</i>	3,32	1,49	0,20	2,11	1,70	0,49
6	<i>Fimicutes</i>	30,78	50,49	31,13	40,30	38,18	34,42
7	<i>Fusobacteriota</i>	4,95	2,28	6,12	5,55	6,28	2,63
8	<i>Proteobacteria</i>	21,43	19,14	27,48	19,22	24,90	33,03
9	<i>Spirochaetota</i>	0,12	1,85	1,46	1,05	1,25	0,48
10	<i>Synergistota</i>	0,29	2,01	1,68	0,61	4,34	0,62
	Tổng	99,93	98,79	98,34	99,75	99,20	98,87

Tại thời điểm lấy mẫu ban đầu (S1), tỉ lệ các ngành tương đồng nhau. Tại thời điểm sau bơm rửa (S2), một số ngành có tỉ lệ giảm mạnh như *Bacteroidota* (giảm 11,8% ở nhóm I và 9,4% ở nhóm II), *Campilobacterota* (giảm 2,8% ở nhóm I và 2,2% ở nhóm II). Một số ngành vi sinh vật tỉ lệ thấp có xu hướng tăng lên, ví dụ như *Spirochaetota* tăng 1,7% ở nhóm I, tăng 0,2% ở nhóm II hay *Synergistota* tăng ~2% ở nhóm I và tăng 3,7% ở nhóm II. Có sự đối nghịch ở 2 nhóm thử nghiệm: Nhóm I chi *Fimicutes* tăng 20% ở lần lấy mẫu S2, và giảm về tỉ lệ như ban đầu ở lần S3. Nhưng tỉ lệ chi này ít biến động và có xu hướng giảm dần ở nhóm II từ 40,3% xuống 34,42%.

Bảng 2. Sự biến động tỉ lệ phần trăm (%) các chi vi sinh vật ở 2 nhóm qua các lần lấy mẫu

STT	Chi vi sinh vật	Nhóm I			Nhóm II		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3
1	<i>Atopobium</i>	3,73	4,2	1,48	6,96	4,31	4,7
2	<i>Bacteroides</i>	4,88	0,26	0,12	1,47	0,56	0,17
3	<i>Porphyromonas</i>	5,89	2,65	2,31	5,32	2,23	0,74
4	<i>Prevotella</i>	5,62	4,71	4,66	3,67	3,48	2,92
5	<i>Tannerella</i>	2,81	0,52	0,41	3,89	2,13	0,35
6	<i>Campylobacter</i>	1,51	0,55	0,34	0,92	0,36	0,12
7	<i>Aerococcus</i>	0	0	0,19	0	0,01	4,19
8	<i>Dialister</i>	1,68	0,68	1,38	1,62	0,77	0,42
9	<i>Enterococcus</i>	0,06	0,01	0	2,23	2,08	0,83
10	<i>Granulicatella</i>	0,13	0,2	0,18	0,25	0,83	1,23
11	<i>Lactobacillus</i>	0,59	0,14	2,48	2,52	0,75	4,22
12	<i>Oribacterium</i>	1,02	1,4	0,51	0,38	0,15	0,91
13	<i>Selenomonas</i>	5,85	1,8	1,71	0,45	0,8	1,47
14	<i>Streptococcus</i>	4,91	9,55	7,78	7,81	17,29	10,63

STT	Chi vi sinh vật	Nhóm I			Nhóm II		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3
15	<i>Fusobacterium</i>	7,48	7,67	3,65	3,48	3,29	1,4
16	<i>Leptotrichia</i>	0,07	0,31	2,96	0,36	1,14	0,76
17	<i>Bosea</i>	5,13	2,26	0,35	6,65	4,83	0,36
18	<i>Haemophilus</i>	0,62	1,61	0,90	1,21	2,27	1,60
19	<i>Lautropia</i>	3,7	2,37	2,07	4,88	4,39	3,35
20	<i>Neisseria</i>	7,11	3,42	3,45	9,36	9,14	8,78
21	<i>Paracoccus</i>	6,13	2,74	0,15	8,67	1,06	0,44
	Tổng	68,92	47,05	37,08	72,1	61,87	49,59

Nhóm I (S1), các chi vi sinh vật ưu thế chiếm 68,92% tới S3, các chi vi sinh vật ưu thế trên giảm xuống chỉ chiếm 37,08%. Khảo sát nhóm 2 (S1) nhận thấy các chi vi sinh vật ưu thế trên chiếm 72,1%, tại lần lấy mẫu S3, các chi vi sinh vật ưu thế trên chiếm 49,59%.

4. Bàn luận

Ngành phong phú nhất trong nghiên cứu này là *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* và *Actinobacteria*. Mối quan hệ tiềm ẩn giữa số lượng vi khuẩn và tình trạng viêm toàn thân đã được nghiên cứu rộng rãi trong những năm gần đây. Trong một nghiên cứu của Demmer [15], sự gia tăng của *Firmicutes* được cho là có liên quan tới quá trình viêm. Nhóm I, chỉ tiêu Faith phylogenetic cho thấy sự đa dạng giảm mạnh ở S2 so với S1, sau đó duy trì mức độ đa dạng ở S3, chỉ tiêu Chao1, Shannon thấy rằng sự đa dạng quần thể vi sinh vật không thay đổi nhiều giữa 3 lần lấy mẫu. Vì vậy, việc sử dụng NaOCl kết hợp với CHX có tác động lên sự đa dạng của quần thể vi sinh vật bằng cách loại bỏ trên diện rộng nhiều vi sinh vật ở các ngành và chi khác nhau. Đối với nhóm II, các chỉ tiêu Chao1, Shannon kết quả tăng lên ở S2, giảm đi ở S3 ($p < 0,05$). Trong khi tính toán theo Faithpd: Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở S2 so với S1 và S3 cũng có xu hướng giảm mạnh sự đa dạng. Từ kết quả trên chúng tôi đã đặt ra giả thuyết, nhóm II sử dụng dung dịch sát khuẩn NaOCl, là dung dịch có tác dụng phân rã mô [16], trong khi đó trong răng viêm quanh chóp mạn tính có nhiều vi khuẩn kỵ khí Gram dương có màng

peptidoglican dày, khó phân huỷ [17] nên việc sử dụng dung dịch NaOCl có tính phân rã mô mạnh sẽ giúp bộc lộ vật liệu di truyền của các nhóm vi sinh vật này tốt, nhưng chưa triệt tiêu được hoàn toàn, vì thế chúng tôi vẫn thu được chúng trong quá trình tách chiết ADN.

Sau khi bơm rửa, một số ngành có tỉ lệ giảm mạnh như *Bacteroidota*, *Campilobacterota*, các ngành vi sinh vật tỉ lệ thấp có xu hướng tăng lên, ví dụ như *Spirochaetota*, *Synergistota*. Có sự đối nghịch ở 2 nhóm thử nghiệm khi ở nhóm I chi *Firmicutes* tăng 20% ở lần lấy mẫu S2, và giảm về tỉ lệ như ban đầu ở lần S3. Nhưng tỉ lệ chi này ít biến động và có xu hướng giảm dần ở nhóm II từ 40,3% xuống 34,42%. Như vậy, có thể nhận thấy rằng ở cả 2 nhóm thử nghiệm thuốc đều cho thấy hiệu quả tốt khi có tác động làm giảm tỉ lệ cao các ngành VSV ưu thế. Tuy nhiên, ở nhóm I, cho thấy sự bảo tồn tốt những chi VSV sau quá trình điều trị hơn so với nhóm II. Có sự biến động trên cả quá trình điều trị, các chi vi sinh vật giảm dần ở cả 2 nhóm, tuy nhiên tỷ lệ VSV trội này ở nhóm I giảm mạnh hơn nhóm II (nhóm I giảm 31,84%, nhóm II giảm 22,51%) cho thấy việc điều trị kết hợp NaOCl với CHX tác động mạnh hơn khi chỉ sử dụng NaOCl, làm nhanh chóng thay đổi tỷ lệ các chi vi sinh vật này.

5. Kết luận

Số lượng trình tự sau giải trình tự được có kích thước trung bình là 254bp (khớp với kích thước vùng V4 trên gene 16S vi khuẩn). Thu được tổng số 27 ngành và 467 chi trong 96 mẫu khảo sát trong đó

có 10 ngành và 21 chi chiếm ưu thế. Quá trình bơm rửa ống tuỷ có sử dụng CHX có tác động lên sự đa dạng của quần thể vi sinh vật ở nhóm bằng cách loại bỏ trên diện rộng diện rộng vi sinh vật ở các ngành và chi khác nhau và tác động mạnh tới hệ vi sinh vật hơn khi không sử dụng CHX.

Tài liệu tham khảo

1. Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA (2021) *The global prevalence of apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis*. *Int Endod J* 54(5): 712-735. doi: 10.1111/iej.13467.
2. Kim S (2010) *Prevalence of apical periodontitis of root canal-treated teeth and retrospective evaluation of symptom-related prognostic factors in an urban South Korean population*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110(6):795-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.07.004.
3. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2013) *Microbiology and treatment of acute apical abscesses*. *Clin Microbiol Rev* 26(2): 255-273. doi: 10.1128/CMR.00082-12.
4. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Akcimen B, Seydaoglu G, Kipalev A, Koksall F (2012) *In vitro susceptibility of E. faecalis and C. albicans isolates from apical periodontitis to common antimicrobial agents, antibiotics and antifungal medicaments*. *J Clin Exp Dent* 4(1):e1-7. doi: 10.4317/jced.50593.
5. Tziafas D, Alraeesi D, Al Hormoodi R, Ataya M, Fezai H, Aga N (2017) *Preparation prerequisites for effective irrigation of apical root canal: A critical review*. *J Clin Exp Dent* 9(10): 1256.
6. Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y (2006) *Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections*. *Oral Microbiol Immunol* 21(2): 112-122.
7. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2005) *Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections*. *J Clin Microbiol* 43(7): 3314-3319.
8. Andrews S (2010) *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. Cambridge, United Kingdom.
9. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M (2016) *MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report*. *Bioinformatics* 32(19):3047-3048. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
10. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR et al (2019) *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2*. *Nat Biotechnol* 37(8): 852-857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
11. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP (2016) *DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. *Nat Methods* 13(7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869.
12. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) *SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB*. *Nucleic Acids Res* 35(21):7188-7196. doi: 10.1093/nar/gkm864.
13. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2012) *The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools*. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue):D590-6. doi: 10.1093/nar/gks1219.
14. Robeson MS 2nd, O'Rourke DR, Kaehler BD, Ziemski M, Dillon MR, Foster JT, Bokulich NA (2021) *REScriPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management*. *PLoS Comput Biol* 17(11):e1009581. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009581.
15. Demmer RT, Breskin A, Rosenbaum M, Zuk A, LeDuc C, Leibel R, Paster B, Desvarieux M, Jacobs DR Jr, Papapanou PN (2017) *The subgingival microbiome, systemic inflammation and insulin resistance: the oral infections, glucose intolerance and insulin resistance study*. *J Clin Periodontol* 44: 255-265.
16. Marion JJC, Manhães FC, Bajo H, Duque TM (2012) *Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment*. *Dental Press Endod* 2: 32-37.
17. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S (2010) *The bacterial cell envelope*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(5):a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

