

# 奶瓶龋的变链菌和乳杆菌水平及产酸分析

钱 虹 李成章 乐进秋

**摘要** 目的:探讨变链菌和乳杆菌与奶瓶龋的关系。方法:将 2~2.5 岁幼儿 30 名分为有龋组和无龋组,每组 15 名。从上前牙唇面刮取牙菌斑,进行细菌培养,对变链菌和乳杆菌数目作出统计。取全口牙菌斑,用酶联仪进行乳酸分析。结果:奶瓶龋儿童有较高的变链菌和乳杆菌检出率,两者检出率均为 100%。龋损部位的变链菌和乳杆菌数目为  $5.10 \pm 1.36$  和  $4.82 \pm 1.18$ ,超过无龋儿童的相应部位。有龋儿童耐酸菌产乳酸量  $13629.16 \text{ nmol/OD} \pm 161.94 \text{ nmol/OD}$  高于无龋儿童。结论:变链菌和乳杆菌可能是奶瓶龋的主要病原菌。

**关键词** 奶瓶龋 变链菌 乳杆菌 乳酸

## Relationship between *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. and Lactate-producing Level and Nursing Bottle Caries

Qian Hong, Li Chengzhang, Yue Jinqiu

The Stomatology College of Wuhan University

### Abstract

**Objective:** The study aimed to investigate the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. as well as the relationship between lactate-productive and aciduric organisms and nursing bottle caries. **Methods:** Totally, 30 children of 2- to 2.5-year-old were divided into two groups, including the group of nursing bottle caries and the group of caries-free. *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. were isolated from dental plaque of all the children. The amount of lactate produced was measured with a microtitre plate reader. **Results:** The isolation frequency of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. were both 100 percent in the children with nursing bottle caries, and that the composition of these bacteria from nursing bottle caries lesions was higher than that of caries-free dental surface. Lactate-producing level was higher in the caries group than that of the caries-free group. **Conclusion:** This study suggests *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. may be the major pathogenic bacteria leading to nursing bottle caries.

**Key words:** nursing bottle caries *Streptococcus mutans* *Lactobacillus* spp. Lactate

长期使用奶瓶的幼儿,奶瓶嘴常吸附于牙面,且饮料中含糖量高,常可使上颌前牙广泛龋蚀,称奶瓶龋<sup>1</sup>。为了研究患奶瓶龋儿童牙菌斑中细菌感染水平,笔者对 2~2.5 岁有奶瓶龋和无龋的儿童牙菌斑中的变链菌和乳杆菌及产乳酸情况进行分析,探讨这些细菌与龋病的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

选择 2~2.5 岁儿童 30 名,其中男 12 名,女 18 名为研究对象。15 名患奶瓶龋的儿童 (dmft = 2) 为奶瓶龋组,均有

长期使用奶瓶或含奶嘴睡觉的习惯。另外 15 名无龋 (dmft = 0) 健康儿童,为无龋组。每名有龋儿童均有 1 名年龄、性别和萌出牙数目与之类似的无龋儿童与其配对。所有儿童取样当天均未刷牙漱口,取样前 2 h 未进食。

### 1.2 取样部位

患奶瓶龋儿童的取样部位为上颌患龋乳前牙唇侧的牙菌斑。每位患龋儿童取 2 个特点部位菌斑样本,为龋损部位和邻近龋损的正常釉质表面。无龋儿童的取样部位为上颌乳前牙唇面颈 1/3 处的菌斑。另外,所有儿童全口牙齿光滑面取菌斑样本。

### 1.3 取样方法

由同一位医生用无菌牙科探针刮取每一部位相同量的牙菌斑,将其置于 1 ml 经过预还原的含巯基醋酸钠和十六烷基三甲基溴化铵等成分的溶液 PBSCT 中,超声振荡 20 s,

vortex 混匀 30 s,然后 10 倍梯度稀释原液(全口菌斑样本除外),从  $10^1$  到  $10^4$ 。

1.4 细菌培养

利用 Spiral 系统涂平皿,每次取 50  $\mu$ l 合适的稀释样本接种于链球菌选择性培养基 TBS 和乳杆菌选择性培养基 RR 上,每种平皿选 2 个不同的稀释样本。在 95%  $N_2$ , 5%  $CO_2$ , 37  $^{\circ}C$  条件下培养 72 h。

1.5 细菌计数

挑取 TSB 和 RR 培养皿上不同形态的菌落做革兰氏染色,镜下观察菌体形态,确定变链菌和乳杆菌。按照菌落形态记数,计算每毫升菌斑稀释液的 CFU 值。

1.6 乳酸分析

将含有全口牙光滑面菌斑样本的溶液取 2 份 200  $\mu$ l 分装于 EP 管中,按 13.2 kr/min 离心 3 min,去上清,分别加入 pH 7.0 和 pH 5.5 磷酸盐缓冲液(PBS) 100  $\mu$ l,混匀,再离心,去上清,加入 PBS。取 3 份 25  $\mu$ l 备好的溶液加入 96 孔板中,pH 7.0 和 pH 5.5 的 PBS 作为对照,乳酸钠作为标准品。在酶联仪上读板,然后在标准品中加反应液(含葡萄糖、颜色试剂、乳酸氧化酶、乳过氧化物酶等)各 35  $\mu$ l,5 min 后读板,最后在标准品除外所有孔中加反应液各 35  $\mu$ l,读板。绘制标准曲线,通过酶联仪上 KC4 软件测出每孔每分钟光密度值(OD 值)的变化。再经过换算得出乳酸产量。通过 OD 值也可以反映细菌量。

1.7 统计方法

检测结果采用  $\chi^2$  检验和  $t$  检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 两组儿童牙菌斑变链菌和乳杆菌的检出率

有龋组和无龋组儿童牙菌斑中变链菌和乳杆菌的检出率见表 1。由表 1 可见,15 名奶瓶龋儿童牙菌斑中变链菌的检出率均为 100%,而无龋儿童变链菌检出率为 86.67%。患奶瓶龋儿童龋损部位乳杆菌的检出率为 100%,但在邻近龋损的正常釉质其乳杆菌的检出率为 93.33%。15 名无龋儿童的牙菌斑中,乳杆菌的检出率为 73.33%。两组儿童牙菌斑中变链菌和乳杆菌的检出率虽有差别,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。

表 1 两组儿童牙菌斑中变链菌和乳杆菌的检出率(%)

细菌种类	奶瓶龋组		无龋组 正常釉质
	龋损部位	正常釉质	
变链菌	100	100	86.67
乳杆菌	100	93.33	73.33

\*  $\chi^2$  检验,  $P > 0.05$

2.2 两组儿童牙菌斑中变链菌和乳杆菌记数

牙菌斑中变链菌和乳杆菌以 CFU/ml 为单位记数,取对数值( $\log_{10}$ )表示,结果如表 2 所示。从表 2 可见,奶瓶龋儿童龋损部位牙菌斑中变链菌和乳杆菌记数超过无龋儿童 100 倍,龋损部位和邻近龋损的正常釉质菌斑中的变链菌数目无明显差异,但龋损部位的乳杆菌数目超出邻近正常釉质 100 倍。

表 2 两组儿童牙菌斑中变链菌和乳杆菌记数( $\bar{x} \pm s, \log_{10}$ )

细菌种类	奶瓶龋组		无龋组 正常釉质
	龋损部位	正常釉质	
变链菌	5.10 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	4.99 $\pm$ 1.43 <sup>a</sup>	2.99 $\pm$ 1.22 <sup>b</sup>
乳杆菌	4.82 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	2.03 $\pm$ 1.06 <sup>b</sup>	2.28 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>

$t$  检验,同种细菌 a 与 b 间有显著差异

2.3 两组儿童牙菌斑稀释液 OD 值及乳酸量

两组儿童全口牙光滑面菌斑的稀释液 OD 值和乳酸量见表 3。从表 3 可见,pH 7.0 和 pH 5.5 条件下,两组儿童全口牙光滑面菌斑稀释液 OD 值反映的细菌量无显著性差异( $P > 0.05$ )。pH 7.0 时两组儿童全口牙光滑面菌斑的乳酸量无显著性差异( $P > 0.05$ ),而 pH 5.5 时有显著性差异( $P < 0.05$ )。

表 3 两组儿童全口牙光滑面菌斑的稀释液 OD 值和乳酸量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	OD 值		乳酸量(nmol/OD)	
	pH 7.0	pH 5.5	pH 7.0	pH 5.5
奶瓶龋组	0.1252 $\pm$ 0.0405	0.0850 $\pm$ 0.0248	13629.1559 $\pm$ 161.9415	7014.5778 $\pm$ 63.9928
无龋组	0.0788 $\pm$ 0.0338	0.0664 $\pm$ 0.0209	13529.9161 $\pm$ 131.5856	2026.5301 $\pm$ 31.8904

3 讨 论

变链菌的存在及数量与年龄和在口腔中滞留部位的数目有关。因而,本研究将年龄和萌出牙数目相似的有奶瓶龋和无龋儿童进行配对,以避免变链菌和乳杆菌计数的偏差。咀嚼、刷牙等可使平滑面牙菌斑聚集量受到限制,个体间差异更大,因而本研究要求研究对象在取样当天不刷牙、不漱口,取样前 2 h 不进食,以保证有足够的牙菌斑,尽量减少个体间的差异。

一般认为,变链菌和乳杆菌与龋病有关<sup>2</sup>,变链菌的致龋能力主要是发酵蔗糖和耐酸,能在 pH 值很低时生存,造成牙齿脱矿<sup>3,4</sup>。乳杆菌极为耐酸,缺乏在牙菌斑中附着和聚集的能力。但龋洞对

微生物提供了保护并形成新的滞留区域,从而为不具有附着能力或不适于寄居于牙面的微生物提供了生存条件。同时损害部位提供新的底物,pH值更低,减少了唾液抗菌因素的影响,有利于乳杆菌、变链菌繁殖。

本研究显示,奶瓶龋及大多数无龋儿童(2~2.5岁)牙菌斑中均能发现变链菌和乳杆菌,在患龋儿童中的高检出率与国外报道一致<sup>5</sup>。El Tayeb等<sup>6,7</sup>曾报道非洲较大无龋儿童变链菌具有高检出率,但年幼儿童少见高检出率。本研究结果中奶瓶龋儿童菌斑样本中的变链菌数目与无龋儿童相应部位变链菌数目相比有显著性差异,亦证实变链菌与龋病有关<sup>5,8</sup>。而邻近龋损的正常釉质表面变链菌数目与龋损部位相当,说明如果保持奶瓶喂养习惯不变,以后龋病发展将会累及这些邻近龋损的釉质<sup>9</sup>。与变链菌一样,奶瓶龋儿童牙菌斑中乳杆菌数目明显高于无龋儿童的相应部位。与变链菌不同的是,龋损部位的乳杆菌数目超过邻近正常釉质。龋洞内乳杆菌数目和产酸能力显著增加,说明龋损一旦形成,乳杆菌就会对龋病发展起作用。

本研究中奶瓶龋儿童和无龋儿童全口光滑面牙菌斑中细菌量无显著差异,表明儿童口腔中微生物含量相当。pH 7.0时,乳酸产量无明显不同,但pH 5.5时,奶瓶龋儿童的乳酸产量明显高于无龋儿童。笔者认为这一结果提示,奶瓶龋儿童耐酸菌(如变链菌、乳杆菌)多,这些菌能在低pH条件下产酸、耐酸,促进龋病的发生发展。

笔者还认为变链菌、乳杆菌与龋病的密切关系说明可从细菌水平评价儿童对龋病的易感性。如果儿童改变饮食习惯,不再使用奶瓶,上述两种细菌的数量及其代谢产物的变化情况还需进一步研究。对儿童成长过程中口腔微生物状况的动态研究,将会对未来龋病的发生作出准确的预测。

## 参考文献

- 1 刘大维主编. 口腔预防医学. 北京:人民卫生出版社,1987:141~143
- 2 Krasse B. Bacteriological factors as indicators of future caries. *Int Dent J*, 1998,38(3):219~224
- 3 樊明文主编. 口腔生物学. 北京:人民卫生出版社,1996:134~136
- 4 凌均棨,樊明文,易安华. 变形链球菌各菌株在不同pH条件下的产酸能力分析. *口腔医学纵横*,1990,6(3):133~135
- 5 Milnes AR, Bowden GWH. The microflora associated with development of nursing caries. *Caries Res*, 1985,19(4):289~297
- 6 El Tayeb Y, Braithall D, Carlsson P. Dental caries and *Streptococcus mutans* in Sudanese schoolchildren. *Odontostomatol Trop*, 1985,8(2):77~85
- 7 Matee MI, Nikx FH, Maselle SY, et al. Mutans streptococci and lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. *Caries Res*, 1992,26(3):183~187
- 8 Boue D, Armau E, Tiraby G. A bacteriological study of rampant caries in children. *J Dent Res*, 1987,66(1):23~28
- 9 Van Hute J, Gibbs G, Butera C. Oral flora of children associated with nursing bottle caries. *J Dent Res*, 1982,62(2):382~387

(1999-12-24 收稿,2001-05-22 修回)

(本文编辑 邓本姿)

## 《临床口腔预防医学》出版

由第四军医大学口腔医学院口腔预防医学教研室李刚副教授编著的《临床口腔预防医学》2000年8月已由世界图书出版西安公司出版发行。本书分为绪论、临床口腔流行病学、常见口腔疾病流行情况、口腔生态环境、临床龋病的基本预防方法、临床牙周病预防的基本方法、临床牙颌畸形预防的基本方法、临床口腔癌预防的基本方法、临床窝沟封闭的应用、临床氟化物的使用、临床营养饮食指导、临床口腔卫生方法指导、临床口腔健康教育、临床不同生长时期的口腔保健、残疾人的口腔保健、口臭的预防与治疗、口腔病灶与全身健康、全身疾病与口腔健康、口腔诊疗室交叉感染及其预防等共十九章。本书总结了国内外在临床口腔医学服务中口腔预防医学研究的理论经验与技术成果,这些丰富的内容预示着临床口腔医学理论与实践将向着以社区大众口腔健康为明确服务目标的转变。本书共计580千字。该书语言简练,实用性强,本书适合各级临床口腔医学工作人员阅读,也适合高等口腔医学院、系,中等卫校口腔医学专业学生学习和各级医院口腔医学进修生学习使用与参考。该书为16开本,精装,铜版纸印刷,每册66.00元。欲购者请汇款至第四军医大学口腔医学院《牙体牙髓牙周病学杂志》编辑部刘含编辑收(西安康复路,710032)。