

不同采样方法对口腔变形链球菌检出率的影响

尹峥嵘 孙贵军 胡慧珍 武涛 何祥一*

(兰州大学口腔医学院 兰州 甘肃 730000)

[摘要] **目的:**比较浓缩含漱法、非刺激性唾液法和棉拭子法对高龋和健康人群口腔唾液中变形链球菌检出率的影响。**方法:**对60例高龋患者和60例无龋者分别用棉拭子法、非刺激性唾液法和浓缩含漱法进行取样,采用轻唾选择培养基对变形链球菌进行培养,结合显微镜观察对3种方法收集到的变形链球菌进行鉴定,并用SPSS22.0对数据进行统计学分析。**结果:**3种采样方法在高龋者中检出率分别为93.33%、96.67%、91.67%,无龋者中检出率分别为56.57%、58.33%、48.33%,无统计学显著性差异。**结论:**3种方法口腔唾液取样一致性较好。其中,棉拭子法采集到的唾液具有良好的代表性。

[关键词] 采样方法 变形链球菌 检出率

[中图分类号] R780.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)10—1056—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.10.009

Effect of Sampling Method on Detection of Streptococcus Mutans. YIN Zheng-rong, SUN Gui-jun, HU Hui-zhen, WU Tao, HE Xiang-yi*. School of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China.

[Abstract] **Objective:** To compare the detection rate of oral Streptococcus mutans in caries-active and healthy patients by concentrated rinse sampling, saliva collection, and cotton swab methods. **Methods:** The samples were collected from 120 patients with cotton swab, saliva collection, and concentrated rinse methods. Streptococcus mutans were cultured in Murashige & Skoog medium, and verified with microscope. The difference in various methods were analyzed by SPSS22.0. **Results:** The detection rates of three methods were 93.33%, 96.67%, and 91.67% in caries-active people, and 56.57%, 58.33%, and 48.33% in healthy people. **Conclusion:** There is no significant difference among three methods ($P > 0.05$). Cotton swab sampling method is the representative method in clinical for its simple, reliable and convenient characteristics.

[Key words] Sampling method Streptococcus mutans Detection rate

龋病是人类最常见的口腔疾病,引起牙齿颜色、形态、质地的改变,它是以细菌为主的多种因素影响下,牙体硬组织发生的慢性进行性破坏性疾病^[1]。根据第三次全国口腔健康流行病学调查结果显示,龋病在我国口腔疾病中发病率最高^[2]。变形链球菌(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*),是G⁺兼性厌氧菌,属于口腔天然菌群之一,是目前公认的主要致龋菌^[3],它广泛分布在口腔唾液、牙菌斑、龈沟液、龋坏牙体等组织中,大量关于龋病病因学的研究均围绕变形链球菌展开。唾液中变形链球菌的检测不仅

利于龋病病因学的研究,同时也被用于龋病治疗效果的观察。1924年J. K. Clarke首次从口腔中分离出变形链球菌,40年后Carlsson J. Edwardsons等学者再次确认了该菌在龋病发病中的重要作用^[4]。变形链球菌在口腔中分布广泛,主要是通过粘附于牙面并分解蔗糖产酸,并且具有耐酸性,造成牙齿脱矿,从而致龋。针对变形链球菌进行早期的检测鉴定可以有效地预防龋病前期的发生、发展,是患者龋活跃性检测的重要指标^[5]。研究变形链球菌的临床采样方法,对于研究其致病性、预防和监测龋病均具有重要意义。

临床微生物样本的采集对微生物检验结果有很大影响^[6],而样本采样过程中的细致化、采集位点的细化及数目是影响微生物检测结果的重要因素之一^[7]。在对口腔微生物的采集中,常用的方法有棉拭子法、含漱法和唾液收集法等。寻找一种简单而又较能全面反应人体口内变形链球菌的采样方法十

基金项目 甘肃省自然科学基金(编号:1308RJZA248)
兰州大学大学生创新创业行动计划项目(编号:20151073001456)

作者简介 尹峥嵘(1996~),女,湖南人,学士在读,主要从事口腔微生物生态学研究。

* 通讯作者 何祥一, E-mail: hexy@lzu.edu.cn

分重要。本文旨在运用微生物培养技术比较棉拭子法、非刺激性唾液法和浓缩含漱法对变形链球菌检出率的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 自 2014 年 3 月~2015 年 11 月在兰州大学口腔医院就诊的 120 名患者,其中高龋者 60 名,无龋者 60 名。龋病的诊断标准采用世界卫生组织(WHO)龋齿调查方法的诊断标准进行,按因龋失、补牙位数(DMFT)计数,高龋者:DMFT \geq 6^[8],无龋者:DMFT=0^[8]。纳入标准:3 个月内无抗菌药物或非甾体类抗炎药物服用史以及牙体牙周治疗史;无全身系统性疾病或除龋病以外的任何口腔疾病。本次研究经兰大口腔医院医学伦理委员会批准,并与受检者签署知情同意书。

1.2 样本的采集 采样过程中,受检者禁食 2 h 后采集样本,同一个体依次用棉拭子法、非刺激性唾液法和浓缩含漱法进行取样。具体方法如下:棉拭子法:将无菌棉拭子放置在口腔底部的潮湿区域中 10 s,置于事先装有 10 mL PBS 液(phosphate-buffered saline, pH 7.2)的标准无菌离心管中^[9]。非刺激性唾液法:采样前半小时用无菌蒸馏水轻轻漱口,收集时受检者低头 45°,舌尖轻抵下前牙,使唾液自然流出,用标准无菌离心管置于其下唇收集唾液 2 mL^[9]。浓缩含漱法:无菌 PBS 液 10 mL,充分含漱 1 min 后吐于无菌离心管内^[10]。唾液样本经 4500 r/min 离心 10 min,弃上清,加 PBS 液 1 mL,混悬后取 620 μ L 加入 100 μ L 甘油,于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,待后期集中培养。

1.3 *S. mutans* 的分离、纯化和鉴定 分别取 100 μ L 样本接种于轻唾选择培养基,在 20% O₂、80% CO₂、37 $^{\circ}$ C 厌氧环境下培养 48 h 后观察 *S. mutans* 生长情况,待菌落出现后,挑取单菌落接种于轻唾选择培养基,反复 3 次,以达到分离纯化的目的,取典型 *S. mutans* 菌落涂片革兰染色,显微镜下观察细菌形态,鉴定是否为目的菌^[11]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS22.0 统计分析软件进行数据处理,对各组结果的差异性采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌落检测及细菌形态学鉴定 将唾液样本接种于轻唾选择培养基上培养,菌种生长良好。在轻唾选择培养基上肉眼可见典型 *S. mutans* 菌落为:直径为 0.5~1 mm 乳白色菌落,质硬,表面呈毛玻

璃样,紧贴培养基表面生长。取典型菌落经革兰染色,于显微镜下观察可见:菌落为半透明,边缘略整齐中心微隆起似雨滴状;油镜(10 \times 100)下可见 *S. mutans* 菌落为 G⁺ 小球菌,呈长链状或短链状,成队或分散排列,证明培养细菌为目的菌,见图 1。



图 1 变形链球菌培养结果

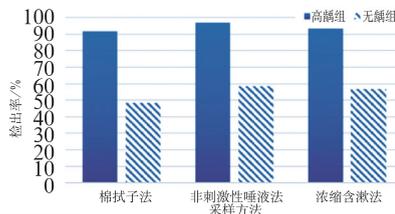


图 2 3 种方法检出率条形图

Fig. 1 The culture of *S. mutans*

Fig. 2 The detection rate of *S. mutans* with three sampling methods

2.2 不同采样方法下 *S. mutans* 的检出率(图 2)

在 60 名高龋患者中,3 种采样方法所收集到的唾液中 *S. mutans* 均有较高的检出率,分别为 93.33%、96.67%、91.67%,且 3 种方法的一致性较好,在统计学上无显著差异;在 60 名无龋者中,同样可检出 *S. mutans*,但 3 种采样方法的检出率较高龋患者低,分别为 56.57%、58.33%、48.33%,三者之间无显著差异($P>0.05$),说明 3 种采样方法对于 *S. mutans* 的检出没有影响,见表 1。

表 1 3 种采样方法对高龋者和无龋者唾液中变形链球菌的检出比较($n=60$)

Table 1 The detection rate of *S. mutans* with three different sampling methods ($n=60$)

敏感人群	采样方法	检出例数	检出率	χ^2	P
高龋组	浓缩含漱法	55	91.67%	1.356	0.508*
	非刺激性唾液法	58	96.67%		
	棉拭子法	56	93.33%		
无龋组	浓缩含漱法	29	48.33%	1.389	0.499*
	非刺激性唾液法	35	58.33%		
	棉拭子法	34	56.57%		

注: * $P>0.05$

表 2 变形链球菌在高龋者和无龋者唾液中检出率的比较

Table 2 The detection rate of *S. mutans* in caries-active and caries-free people

采样方法	高龋组	无龋组	χ^2	P
	检出率/%	检出率/%		
棉拭子法	93.33	56.57	21.551	0.000*
非刺激性唾液法	96.67	58.33	25.281	0.000*
浓缩含漱法	91.67	48.33	26.825	0.000*

注: * $P<0.01$

对 *S. mutans* 在高龋患者和无龋者中的检出率分别进行比较,采用 SPSS22.0 统计分析软件进

行 χ^2 检验,在3种不同采样方法下,高龋组 *S. mutans* 的检出率与无龋组之间的差异具有统计学意义(均为 $P < 0.01$),表明高龋患者唾液样本中 *S. mutans* 的检出率显著高于无龋组,见表2。

3 讨论

本研究对60例高龋患者和60例无龋者采用棉拭子法、非刺激唾液法和浓缩含漱法采集唾液,用轻唾选择培养基结合显微镜观察法进行检测和鉴定。

3种采样方法可能对采样结果的影响如下。首先,三种唾液采集方法采集到的唾液量有着明显的区别,其中棉拭子法 $<$ 非刺激性唾液法 $<$ 浓缩含漱法。其次,棉拭子法和浓缩含漱法使用了其他物质与唾液接触,比如无菌棉拭子和无菌PBS液等,这些物质在采集的过程中改变了口腔微生物的生存环境,他们的成分或者携带物可能会对微生物的活性存在影响。棉拭子法和浓缩含漱法在采集过程中会带下口腔中的其他组织,如脱落的口腔上皮、食物残渣等,可能对离心过程有一定影响。采用非刺激性唾液法,部分患者因个体差异未能或只能留取少量唾液,需延长采样时间,常引起受试者的抵触情绪,因唾液分泌由交感神经控制^[12],由此可能间接影响唾液微生物的检测结果。

本研究中采用了选择性培养法鉴定变形链球菌,虽然检测时间稍长,但培养法有利于临床医生更直观准确地观察龋病的微生物致病因素。研究结果显示3种采样方法的检出率没有显著差异,表明这3种方法对于变形链球菌的检出无影响,对检出结果的可能影响并不明显。通过临床采样,结合医生的可操作性和患者的依从性,棉拭子法更加简便快捷且易被患者所接受,更易获得患者的配合,是临床上一种较为理想的采样方法。为了避免棉絮对测试结果的影响,有学者采用了一些新的收集工具,如聚苯乙烯泡沫棉签、人造棉棉球、聚酯 Salivette 等,有利于收集到更高质量的唾液样本,为唾液广泛应用于检测奠定基础^[13]。

此外,本研究还发现采用3种不同采样方法所得的唾液样本中高龋组变形链球菌的检出率均显著高于无龋组($P < 0.01$),这与国内外的学者研究结果相似^[14~18],也证实了3种不同采样方法对于变形链球菌的检出没有影响。这些研究一致认为,龋病的发生是在微生物的综合作用下进行的,唾液微生物群中变形链球菌检出率的变化与龋病状况有关。但是,本研究还发现在采用三种方法采集唾液时,高龋组中变形链球菌的检测有阴性结果存在的现象,

证实了变形链球菌的检出率与龋敏感程度呈正相关^[19]这一观点,也说明了龋病致病因素的复杂性。

本研究结果表明,采用棉拭子法、非刺激唾液法和浓缩含漱法对口内变形链球菌的检出没有影响。在高龋患者和无龋者中的检出率分别为93.33%、96.67%、91.67%;56.57%、58.33%、48.33%,经 χ^2 检验,差异不具有统计学意义($P = 0.508$; $P = 0.499$)。本次实验样本量和细菌种类均较少,是否可以全面真实的反应患者口内龋病状况,还需扩大样本量,增加致龋菌检测种类或者增加变量来进一步深入研究。

参考文献

- [1] Wade W G. The oral microbiome in health and disease[J]. Pharmacological research, 2013, 69(1): 137-143
- [2] 齐小秋.第三次全国口腔健康流行病学调查报告[M].北京:人民卫生出版社,2008,1-12
- [3] Koo H, Falsetta M L, Klein M I. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm[J]. Journal of dental research, 2013, 92(12): 1065-1073
- [4] Swadas M, Dave B, Vyas S M, et al. Evaluation and comparison of the antibacterial activity against streptococcus mutans of grape seed extract at different concentrations with chlorhexidine gluconate: an in vitro study[J]. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2016, 9(3): 181
- [5] 郭军.龋活跃度检测方法的临床应用进展[J].中国美容医学, 2014, 23(6): 512-514
- [6] 吕海超.临床微生物标本采集对微生物检验结果的重要性[J].医药,2017(1): 00288-00288
- [7] 徐欣,何金枝,周学东.口腔微生物群落在口腔与全身疾病预警中的作用[J].华西口腔医学杂志,2015,(06): 555-560
- [8] Yang F, Zeng X, Ning K, et al. Saliva microbiomes distinguish caries - active from healthy human populations[J]. The ISME journal, 2012, 6(1): 1-10
- [9] Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, et al. Candida concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs[J]. BMC oral health, 2015, 15(1): 150-156
- [10] 王少果,游祥磊,车春晓,曾飒,周建业,李志强,何祥一.16SrRNA高通量测序研究有龋者唾液微生物群落结构及多样性[J].口腔医学研究,2015,31(5): 461-465
- [11] Luis H S, Luis L S, Bernardo M. In vitro study of the effect of an essential oil and a delmopinol mouth rinse on dental plaque bacteria[J]. Indian Journal of Dental Research, 2016, 27(6): 648-653
- [12] Proctor G B, Carpenter G H. Salivary secretion: mechanism and neural regulation[M]. Saliva: Secretion and Functions, 2014, 24(1): 14-29
- [13] Kidd S, Midgley P, Lone N, et al. A re-investigation of saliva collection procedures that highlights the risk of potential positive interference in cortisol immunoassay[J]. Steroids,

2009, 74(8): 666-668

- [14] 黄雅静, 黄锐, 钱英子, 等. 儿童口腔内变形链球菌、乳酸杆菌的检出情况分析[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(2): 106-109
- [15] 曹元书, 刘兴容. 不同龋敏感儿童变异链球菌临床分离株耐酸能力的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(12): 691-693
- [16] 冯岩, 严恒, 薛凯佳, 卢友光. 高龋无龋儿童乳牙牙菌斑的微生物差异[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(1): 55-58
- [17] Jiang S, Chen S, Zhang C, et al. Effect of the Biofilm Age and Starvation on Acid Tolerance of Biofilm Formed by *Streptococcus mutans* Isolated from Caries-Free and Caries-Free Adults[J]. International Journal of Molecular

Sciences, 2017, 18(4): 713

- [18] Singla D, Sharma A, Sachdev V, et al. Distribution of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in dental plaque of Indian pre-school children using PCR and SB-20M agar medium[J]. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR, 2016, 10(11): ZC60
- [19] Fragkou S, Balasouli C, Tsuzukibashi O, et al. Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus and Candida albicans in oral samples from caries-free and caries-active children [J]. European Archives of Paediatric Dentistry, 2016, 17(5): 367-375

[收稿日期: 2017-04-28]

(本文编辑 汪喻忠)

口腔盛宴 博览齿科

2017“中部国际口腔展 CDE”邀你武汉一聚

2017 中国中部(武汉)国际口腔设备材料展览会与口腔医学学术会议和 2017 中国口腔医学人才招聘大会(以下简称“中部国际口腔展”)是立足江城武汉,辐射中部乃至全国的口腔专业展会和口腔医学学术论坛。

本届展会由湖北省口腔医学会、中部口腔医学协作组和中英合资好博塔苏斯展览有限公司联袂主办,展会致力于搭建口腔专业领域大型综合性、国际性交流平台,为口腔医疗机构、口腔医疗设备制造商和口腔医务工作者以及口腔医学的学子们,创造广泛交流专业信息、采购专业设备、洽商合作的机会,为推动与繁荣蓬勃发展的中部口腔医疗行业共襄盛举。展会将以专业的营销推广、展示平台搭建、数据建设和现场服务,优化传统口腔行业资源,对本届展会进行整合升级。

2017“中部国际口腔展 CDE”展会三会融合,功能丰富,相辅相成满足中部需求。一是会议展览一体化,口腔医学会议独占鳌头。学术会议将连续举办 3 天,专题会议场数不低于 100 场,与会注册人数不少于 1000 人。二是人才招聘,全国独创平台。口腔医疗人才招聘大会是本届展会的亮点。通过武汉大学口腔医学院举办有年的活动,提升服务,旨在服务口腔医学专业的毕业生就业需要。三是多样配套活动集聚,搭建中部最大交流平台。现场手术室、实操培训班集聚;病例大赛、护理操作技能大赛、现场评讲活动吸引眼球;现场儿童义诊活动,普及健康知识;专委会专业培训会议、联盟活动等碰撞交流。

2017 展会预计展览面积 10,000 平方米,参展企业 300 余家。除了中国本土的参展企业,众多国际知名企业和优质买家也将参加盛会。专业器械商及观众预计突破 10000 人次。展览范围涉及口腔医疗器械和口腔预防保健产品,包括口腔影像设备、口腔修复设备器材、口腔内科设备器材、口腔正畸设备器材、口腔外科设备器材、口腔种植设备器材、技工设备器材、口腔清洁、牙齿保健产品等。

本次“中部国际口腔展”将于 2017 年 11 月在武汉国际博览中心全新起航。通过本次会议进一步加深各方合作、增进友谊、谋求多方共赢、推进共同发展,更多交流、更多活动、更多精彩将闪亮呈现!

我们期待您的参与!

大会咨询:湖北省口腔医学会秘书长 李四群 027-87686090

参展/会议咨询:027-87362650(江先生) 027-87362682(刘女士)

参观咨询:027-87368919(喻女士)

招聘咨询:027-87362603(李女士) 027-87362597(吴女士)