

• 临床检验研究论著 •

长期海上航行官兵口腔黏膜细菌学变化研究

何立东, 胡明, 韩善桥[△]

(中国人民解放军海军总医院中心实验科, 北京 100048)

摘要: 目的 了解执行长期海上航行官兵任务前、中、后期口腔黏膜细菌分布变化, 为舰艇官兵长期海上航行期间口腔疾病的防治提供依据。方法 用采样拭子采集口腔黏膜标本 164 份, 进行细菌培养, 根据细菌在不同培养基上的生长情况进行细菌分纯, 取纯培养细菌进行手工鉴定及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定。结果 从 164 份口腔黏膜标本分离出病原菌 18 种 64 株。任务后期与前期比较, 病原菌分离数量增加, 栖居菌分离数量减少。医疗组与机电组比较, 在任务中、后期病原菌检出率之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 栖居菌检出率之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 长时间海上航行, 舰员易发生航行疲劳, 导致机体免疫功能下降, 口腔菌群失调, 正常栖居菌数减少, 而病原菌数增加, 容易引发口腔及其他系统疾病。

关键词: 口腔黏膜; 病原菌; 栖居菌; 长期海上航行**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.021**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2014)08-0987-03

Bacteriological change in buccal mucosa during long-term voyage

He Lidong, Hu Ming, Han Shangqiao[△]

(Centre of Basic Medical Science, Navy General Hospital PLA China, Beijing 100048, China)

Abstract: Objective To study the bacteriological change in buccal mucosa of sailors during long-term voyage and provide basis for the prevention and treatment of buccal diseases. **Methods** Bacterial cultivation, isolation of 164 buccal mucosa specimens were used and analyzed by both handwork and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) identification. **Results** 18 species and 64 strains of pathogenic bacteria were isolated from the whole samples. The number of pathogenic bacteria increased while the number of dwelling bacteria decreased significantly later in the voyage. Comparing with the medical group, the number of pathogenic bacteria detected in mechanical and electrical group was significantly high ($P < 0.05$), during and after the long-term voyage. As for dwelling bacteria, no significant difference was observed in between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Sailors to fatigue during long-term voyage indicates by decline of immunological function and buccal dysbacteriosis, which easily lead to buccal and other system diseases.

Key words: buccal mucosa; pathogenic bacteria; dwelling bacteria; long-term voyage

近年来, 人类微生物组对人体各种微生物及其基因进行研究, 阐明了微生物在人类健康和疾病中的作用, 为疾病的预防、诊断和治疗提供帮助^[1-2]。口腔正常菌群的各种微生物之间除能相互制约外, 还能阻止或干扰其他病原体的定植, 对机体提供一定的保护作用^[3]。本研究探讨长期海上航行舰艇官兵口腔细菌的变化特点, 为提高长期海上航行官兵的卫勤保障提供依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料 采样对象为长期海上航行舰员, 其中, 医疗组 30 人, 机电组 25 人; 任务前期采样 55 份, 任务中期采样 55 份, 任务后期采样 54 份, 共采集标本 164 份。

1.2 仪器与试剂 (1)口腔黏膜采样及运送系统, 包括 92 mm × 16 mm 细菌采样管(内含脑心浸出液肉汤 3 mL)和采样拭子(编号: MT0101), 由北京友康基业生物科技有限公司生产。(2)培养基, 血琼脂平板(编号: PB0115A, Oxoid 公司), 用于一般细菌的分离培养; 中国蓝琼脂平板(编号: PO5060A, Oxoid 公司), 主要用于革兰阴性杆菌的分离培养; 巧克力琼脂平板(编号: PB0136A, Oxoid 公司), 主要用于嗜血杆菌和奈瑟菌的分离培养; 沙保罗琼脂平板(编号: PO0160A, Oxoid 公司), 主

要用于真菌的分离培养。(3)基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Bruker microflexTM MALDI-TOF-MS Bio TyperTM), 由德国布鲁克公司生产。

1.3 细菌质控菌株 大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 和金黄色葡萄球菌 ATCC25923, 由中国药品生物制品检定所提供。

1.4 方法

1.4.1 标本采集 用采样拭子在口腔黏膜进行涂抹, 放入细菌采样管中, 对于不能立即培养的标本放 -20 ℃ 冰箱保存。

1.4.2 细菌培养与分离 将口腔黏膜细菌标本(如果是冻存标本, 先室温解冻, 再置于 35 ℃ 培养箱培养 6 h)分别接种血琼脂平板、中国蓝琼脂平板、巧克力琼脂平板和沙保罗琼脂平板, 放 35 ℃ 培养箱培养 24~48 h, 根据细菌在不同培养基上的生长情况和菌落的不同特征进行细菌分纯, 得到纯培养细菌。

1.4.3 细菌鉴定 取血琼脂平板、中国蓝琼脂平板、巧克力琼脂平板和沙保罗琼脂平板上的纯培养细菌进行手工及质谱仪鉴定。手工鉴定先进行革兰染色, 镜下观察, 根据染色结果选做触酶、氧化酶、DNA 酶、动力和氧化发酵试验进行初步分科, 再按科内各菌属的鉴别方法鉴定到种。质谱仪鉴定微生物处

本研究发现早期肝硬化组患者 AFP 水平显著升高,提示患者肝细胞破坏程度加剧,具有发生肝癌的风险。在监测慢性乙型肝炎患者是否发生早期肝硬化及是否有癌变趋势时,定期监测 AFP 水平有一定的应用价值。

慢性乙型肝炎患者随着肝纤维化程度的加重,发生肝硬化和肝衰竭,患者血清 GGT、PT 水平也逐渐升高,而血小板水平则逐步降低,其水平与肝纤维化程度发展一致。肝脏是人体内多种凝血因子生成的主要场所,当乙型肝炎病情恶化,肝细胞产生血小板减少,凝血因子缺乏,造成凝血时间延长及发生出血倾向。这与国内一些研究结果相一致^[3,7]。

HBsAg 水平与 HBeAg($r = -0.482, P = 0.000$) 和 HBV DNA($r = -0.448, P = 0.000$) 水平呈负相关,与其他项目无明显相关性。这可能与 HBsAg 定量检测技术^[8-9]、患者自身免疫状态,感染的 HBV 病毒基因型别、基因变异等有关。

综上所述,在常用监测慢性乙型肝炎患者病情的项目中,对肝纤维化病变的诊疗价值有限。现今对肝纤维化非创性综合诊断体系建立有不少进展和新的成果,但有些指标或参数还不能在大多数医院推广和应用^[10]。GGT、PLT 和 PT 与肝纤维化分期具有显著性相关,其水平随肝纤维化病变的加重而变化,可用于临床预测和辅助诊断肝纤维化病程以提高临床疗效。而对早期肝硬化与明显肝纤维化病变的鉴别上,HBsAg 与 AFP 的应用具有进一步研究的价值。

参考文献

- [1] Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis; a need for re-

(上接第 988 页)

研究发现,远洋航行期间,由于多种原因导致机体抵抗力降低,口腔正常菌群的平衡被打破,使病原菌(如黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌)数量增加,栖居菌(如口腔链球菌)数量减少。机电组在任务中、后期病原菌种类增加,由于机电官兵工作时间长,劳动强度大,工作环境差,机舱内高温、高湿、噪音大、有害气体多,对机体影响大,口腔细菌变化明显。

王峰等^[9]报道,长期海上航行官兵龋齿、牙周疾病和口腔溃疡的发病率分别为 22.7%、80.9% 和 25.2%。扈祚文等^[10]报道,长期海上航行官兵牙周疾病的发病率,出海前为 78.0%,出海后达到 90.9%。研究表明,长时间海上航行,由于环境恶劣、任务繁重、精神紧张、食物供应单调、缺少新鲜蔬菜水果,舰员饮食含脂肪和糖摄入比重偏重,无机盐和维生素摄入不足,易发生长期海上航行疲劳,可导致机体免疫功能下降,口腔菌群失调,引发口腔疾病^[11]。

参考文献

- [1] Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature, 2012, 486 (742): 207-214.

- assessment[J]. J Hepatol, 1991, 13(3): 372-374.
[2] 梁晓峰,陈园生,王晓军,等.中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J].中华流行病学杂志,2005,26(9):655-658.
[3] 陆伦根,曾民德.肝纤维化的非创性诊断和评估[J].中华肝脏病杂志,2008,16(3):165-168.
[4] Sebastiani G, Vario A, Guido M, et al. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C[J]. J Hepatol, 2006, 44(4): 686-693.
[5] 葛成龙,徐娜.乙型肝炎表面抗原定量的临床研究进展[J].中西医结合肝病杂志,2012,22(3):190-192.
[6] 阮福明,许立新.定量检测 HBsAg 水平在评价拉米夫定治疗慢性乙型肝炎疗效中的应用[J].临床检验杂志,2011,29(9):693-694.
[7] 中华医学会肝病学分会和感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南 2010 年更新版[J].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5 (1):79-100.
[8] 中华肝脏病学肝纤维化学组.肝纤维化诊断及疗效评估共识[J].中华肝脏病杂志,2002,10(5):327-328.
[9] 安宏亮,钟婉婷.时间分辨免疫荧光法检测 HBsAg 在低浓度范围的应用价值[J].国际检验医学杂志,2013,34(1):79-80.
[10] 蒋忠胜,温小凤.慢性肝病肝纤维化非创伤性诊断模型的研究进展[J].肝脏,2008,13(5):431-433.

(收稿日期:2013-11-18)

- [2] The Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research[J]. Nature, 2012, 486(2): 215-221.
[3] 亓庆国.口腔微生物学[M].济南:山东大学出版社,2011:1-157.
[4] 薛晶,肖丽英,周学东.人体口腔微生物组研究最新进展[J].华西口腔医学杂志,2010,28(1):5-8.
[5] 耿雪,王岚,刘新,等.牙周疾病对系统性疾病发展的影响[J].沈阳医学院学报,2011,13(1):57-60.
[6] 叶应妩,王毓三,中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].2 版.南京:东南大学出版社,1997:474-526.
[7] 俞树荣.微生物学和微生物学检验[M].2 版.北京:人民卫生出版社,1997:143-294.
[8] 鲁辛辛,袁梁.新技术在微生物检验中的应用[J].中华检验医学杂志,2009,32(5):596-600.
[9] 王峰,刘世森.某舰护航官兵口腔健康状况调查分析[J].海军总医院学报,2011,24(1):19-20.
[10] 扦祚文,钟文,董振海.长时间远航舰船官兵牙周病状况调查[J].海军医学杂志,2011,32(3):145-146.
[11] 曾霞,黄志强,宫峰,等.长期海上航行舰艇人员常见病的防治[J].海军医学杂志,2012,33(1):4-6.

(收稿日期:2014-02-18)

理方法:培养单菌落后分离灭活,将菌体蛋白溶于 50 μL 70% 甲酸(FA)和 50 μL 乙腈(ACN)中,充分混匀,高速离心后吸取上清液上质谱仪鉴定。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 任务前、中、后期口腔黏膜病原菌分布 164 份口腔黏膜标本分离出病原菌 18 种 64 株,结果见表 1。口腔黏膜分离出的主要病原菌有金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌,3 种细菌的分离率分别为 31.3%、17.2% 和 9.4%。其中金黄色葡萄球菌质谱图见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 任务前、中、后期口腔黏膜病原菌分布(*n*)

细菌名称	任务前	任务中	任务后	合计
	病原菌数	病原菌数	病原菌数	
金黄色葡萄球菌	1	10	9	20
肺炎克雷伯菌	1	2	8	11
阴沟肠杆菌	3	0	3	6
黏质沙雷菌	0	1	3	4
无乳链球菌	1	0	2	3
阿氏肠杆菌	1	0	2	3
热带假丝酵母菌	0	2	1	3
约氏不动杆菌	1	1	0	2
琼氏不动杆菌	1	1	0	2
白色假丝酵母菌	0	0	2	2
肺炎链球菌	0	1	0	1
粪肠球菌	0	1	0	1
神户肠杆菌	0	0	1	1
目勾维肠杆菌	0	0	1	1
变栖克雷伯菌	0	1	0	1
布氏枸橼酸杆菌	1	0	0	1
蜡样芽孢杆菌	0	1	0	1
产吲哚黄杆菌	0	1	0	1

2.2 任务前、中、后期口腔黏膜栖居菌分布 164 份口腔黏膜标本分离出栖居菌 18 种 339 株,结果见表 2。主要栖居菌有卡他布兰汉菌、口腔链球菌和表皮葡萄球菌,3 种栖居菌的分离率分别为 43.9%、40.1% 和 7.4%。其中表皮葡萄球菌质谱图见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 2 任务前中后口腔黏膜栖居菌种类和数量(*n*)

细菌名称	任务前	任务中	任务后	合计
	栖居菌数	栖居菌数	栖居菌数	
卡他布兰汉菌	49	51	49	149
口腔链球菌	51	48	37	136
表皮葡萄球菌	7	10	8	25
副血链球菌	1	0	5	6

续表 2 任务前中后口腔黏膜栖居菌种类和数量(*n*)

细菌名称	任务前	任务中	任务后	合计
	栖居菌数	栖居菌数	栖居菌数	
黏滑罗氏菌	2	1	1	4
戈氏链球菌	1	0	2	3
嵴链球菌	0	1	1	2
缓症链球菌	2	0	0	2
泛口腔链球菌	0	1	1	2
浅黄奈瑟菌	2	0	0	2
前庭链球菌	1	0	0	1
深黄奈瑟菌	1	0	0	1
恒河猴奈瑟菌	1	0	0	1
奥斯陆莫拉菌	0	1	0	1
放射土壤杆菌	0	1	0	1
溶血葡萄球菌	0	0	1	1
人葡萄球菌	1	0	0	1
假白喉棒状杆菌	1	0	0	1

2.3 任务前、中、后期医疗组与机电组口腔黏膜细菌数量变化 医疗组与机电组比较,在任务中、后期病原菌检出率之间差异有统计学意义($P < 0.05$),栖居菌数检出率之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

在正常状态下,口腔黏膜可形成一种保护性屏障,阻止病原微生物入侵。机体与口腔微生物之间保持一种动态平衡,为维护人体健康发挥重要的作用,如果这种生理平衡被打破,则非致病微生物可转化成条件致病微生物,导致各种感染的发生。人类口腔微生物组数据库的建立为人们了解、认识复杂的口腔微生物环境提供了一个崭新的平台,为各种口腔疾病的防治奠定了坚实的基础^[1-5]。

健康人体的口腔包含上百种不同的细菌、病毒和真菌等微生物。口腔中的大部分细菌是兼性厌氧菌,少部分是需氧和厌氧菌。大多数口腔微生物还不能用常规方法培养出来。在不同宿主的口腔中,用常规培养方法检出微生物的差别很大,通常有 0~7 种微生物被检出。现代生物技术以 DNA 为基础的一系列研究方法,如 16S rRNA 基因技术、高通量指纹技术、宏基因组学技术及下一代测序技术,使人类可以在结构复杂性和基因多态性的意义下更清晰地研究和了解人体口腔微生物菌群^[3-4]。

口腔细菌的鉴定方法有多种,如传统手工法、细菌鉴定仪及质谱仪等方法。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪是一种能够快速对致病微生物进行精确到种的全自动快速鉴定系统。该系统采用检测微生物的蛋白质指纹谱图,通过专用软件对这些指纹谱图进行处理并与专用的微生物数据库中各种已知微生物的标准指纹图谱进行比对,从而完成对微生物的鉴定。质谱技术具有大规模、高通量的特点,可对传染病原体进行快速筛查、鉴定与预警^[6-8]。

对长期海上航行官兵口腔黏膜标本的(下转第 991 页)