

存红细胞的质量,应尽量把白细胞清除^[5,6]。

从三种试剂红细胞实验结果比较来看,Coulter STKS 稀释液配制的试剂红细胞保存期最长(20 d),并且红细胞抗原稳定及溶血率低,Bayer2120 稀释液配制的试剂红细胞最早发生溶血(15 d),雅培 CD1700 稀释液配制的试剂红细胞居中(18 d)。

在临床实验室的日常工作中,ABO 反定型检测都是在开放状态下进行的,在其有效期内应无细菌生长,否则不能应用。实验结果显示,Coulter STKS 稀释液配制的试剂红细胞的细菌培养在第21 d后开始有细菌生长,Bayer2120 和 CD1700 稀释液的分别是第15 d 和第18 d 后开始长菌。

对于同一来源的红细胞,其膜的稳定性、脆性等基本相同,并且由于Hb在相当长的时间内能稳定地存在,所以测定游离Hb能够很好地反映红细胞的破坏情况。但要注意用肉眼观察上清液的颜色变化来判断有无溶血,是不准确的。

综合上述几个指标的结果,可以看出几个指标的变化交汇处正是判别试剂红细胞的有效期的时间,我们的研究表明:用Coulter STKS 稀释液配制的试剂红细胞有效保存期为20 d,雅培

CD1700 试剂红细胞的有效期是18 d,Bayer2120 试剂红细胞的有效期是15 d,3种稀释液配制的试剂红细胞在2 w 时间内是安全有效的,检测结果是可靠的。用血细胞分析仪稀释液配制试剂红细胞简单且经济,有效期可达2 w,适于基层医院血库使用,值得推广。

参考文献:

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[S].3版.南京:东南大学出版社,2006.
 [2] 高峰.输血与输血技术[M].北京:人民卫生出版社,2003.
 [3] 孙爱农,吴晓燕,曹铁源,等.一种新型试剂红细胞保养液的制备和应用[J].中国输血杂志,2002,15(16):394-396.
 [4] 罗广平,汪传喜,肖露露.GZB 试剂红细胞4℃保存液的研究及其临床应用[J].实用医学杂志,1995,11(3):154-155.
 [5] Bratosin D,Leszczynski S,Sartiaux C, et al. Improved storage of erythrocytes by prior leukodepletion; flow cytometric evaluation of stored erythrocytes[J]. Cytometry,2001,46(6):35.
 [6] 樊凤艳,周虹.红细胞4℃保存研究进展[J].中国输血杂志,2006,19(2):155-157.

收稿日期:2009-02-19
 修回日期:2009-03-03

PCR 法检测龈下菌斑中致病菌群分布的实验研究*

傅尧^a,符义富^a,游丽萍^a,曾以周^b,周炳荣^b,杨卫东^c

(南京大学医学院附属口腔医院 a. 检验科;b. 外科;c. 内科,南京 210008)

摘要:目的 建立牙周致病菌的16S rRNA 序列分析方法,讨论洁悠神长效抗菌材料对牙周病患者龈下菌斑的作用及牙周致病菌的分布。方法 对376位牙周病患者(成年组306例、儿童组70例)在洁悠神长效抗菌材料用药前、后龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌(Pg)、伴放线嗜血杆菌(Aa)、福赛斯坦纳菌(Tf)、具核梭杆菌(Fn)、中间普氏菌(Pi)5种牙周炎相关致病菌分别进行培养法和16S rRNA 序列分析技术检测。结果 PCR法和培养法的检出率分别为Pg(40.96%,17.82%),Tf(88.56%,27.66%),Fn(81.91%,23.67%),Pi(57.98%,19.15%),Aa(19.15%,9.31%),除Aa($P>0.05$)差异无统计学意义外,后者检出率明显低于前者($P<0.01$),儿童组的检出率明显低于成人组($P<0.05$);用药后的PCR法和培养法检出率都明显低于用药前($P<0.05$),差异有统计学意义。结论 通过16S rRNA 序列分析技术对牙周病患者致病菌的分析,可以对目前技术上能培养以及无法培养的牙周菌进行分类,对防治牙周感染具有一定的指导作用。

关键词:16 SrRNA 序列;牙周致病菌;厌氧菌;洁悠神长效抗菌材料

中图分类号:R781.4;Q503 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2009)03-115-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2009.03.045

牙周疾病是由细菌感染引起的,牙龈卟啉单胞菌(Pg)、伴放线嗜血杆菌(Aa)、福赛斯坦纳菌(Tf)、具核梭杆菌(Fn)、中间普氏菌(Pi)是其重要的致病菌。流行病学研究显示20%~50%的牙周致病菌为螺旋体^[1],龈下菌斑中的微生物及其代谢

产物是引发牙周炎的始动因子,在以往的牙周病原菌的研究中,由于其分离鉴定比较困难,牙周炎相关致病菌很长时间一直难以检测;本研究使用16 SrRNA 序列分析技术检测牙周病患者龈下菌斑细菌的变化,了解其分布趋势,并与培养法相比较,旨

* 基金项目:南京市科技计划项目(编号:200504019)。

作者简介:傅尧(1971-),女,学士,主管技师,从事临床检验工作。

通讯作者:曾以周,男,主任医师,E-mail:fuyifu897@yahoo.cn.

在探求一种适合于临床的、敏感快速的牙周菌斑检测方法,为临床防治感染提供参考。

1 材料与方法

1.1 临床资料 2005年8月~2007年8月在本院门诊治疗的376位患者,所有患者均经本院牙周科医生确诊为慢性牙周炎(CP),均愿接受洁悠神物理抗菌喷雾敷料治疗,分为两组:成年组:306例,男性152例,女性154例,年龄35~60岁;儿童组:70例,男性36例,女性34例,年龄7~12岁。

1.2 主要试剂及设备 洁悠神长效抗菌材料(南京神奇科技开发有限公司提供,规格30 ml/瓶,剂量为0.1 ml/次),GENbox anaer REF124厌氧培养箱(法国梅里埃公司),REF124厌氧产气袋(批号:24B05-12)、REF 96 118厌氧指示器(批号:08904B)购自德国 Merck KGaA 公司,BSK培养基(英国 Oxoid 公司),Chelex-100(Sigma 公司),PCR试剂盒、蛋白酶K液(上海生工公司),PCR扩增仪(PTC-200),紫外分光光度仪(Genequant pro 公司)。

1.3 标本的采集 龈下菌斑标本均由本院牙周科医生收集。先用无菌生理盐水冲洗每例患者的病变位点三遍,再用无菌龈上、下刮治器去除取样牙齿上的菌斑,一份立即放入灭菌后肉汤培养的RTF管中,加无菌液体石蜡封闭;一份放入无菌Eppendorf管中,-70℃保存。用药方法:在第一次标本采集病变位点部面(缘)喷涂洁悠神长效抗菌材料,剂量为0.1 ml/次,每日3次。采样时间为每例患者用药前及用药后第2 d。

1.4 细菌培养和初步鉴定 将RTF管中的标本用振荡器混匀60 s,采用硫乙醇酸盐稀释,选择稀释度为 10^{-3} 的浓度,接种至BSK平板培养基中,再将BSK培养基放在厌氧培养箱内培养7 d(BSK培养基在使用前于 $N_2:H_2=0.95:0.05$ 环境中预还原24~48 h)。按Bergery系统细菌鉴定标准,根据菌落特征挑选单个菌落涂片做革兰染色和初步生化鉴定。

1.5 PCR引物、方法及细菌DNA的提取

1.5.1 PCR引物设计与合成:5种牙周致病菌的16S rRNA特异性引物序列设计参考文献^[2~5]。上、下游引物的核苷酸序列5'→3',PCR扩增片段长度及退火温度分别是:龈下菌斑中牙龈卟啉单胞菌(Pg) TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC和ACGTCATCCACACCTTCCTC^[2], 131bp, 58℃;伴放线嗜血杆菌(Aa) GCTAATACCGGTAGAGTCGT和ATTTACACCTCACTTAAAGGT^[3], 235bp, 59.5℃;福赛斯坦纳菌(Tf) GTCG-GACTAATACCTCATAAAACA和TCGCCAT

TGACCAATATT^[4], 419bp, 59.5℃;具核梭杆菌(Fn) GGCCACAAGGGGACTGAGACA和TT-TAGCCGTCACCTTCTTCTGTTGG^[5], 185 bp, 59.5℃;中间普氏菌(Pi) GTGCTTGACATTCTGGACGTGCAC和CGTCTGCAATCAAGCCGGGYAAG^[6], 367 bp, 57℃。

1.5.2 细菌DNA的提取及PCR的方法:参照文献^[6],在含有牙周致病菌斑块的Ep管中加入20 mg/ml蛋白酶K液4 μl和5% Chelex-100液150 μl,振荡10 min混匀,取上清液-20℃保存。PCR总反应体系为22 μl;DNA模板2 μl,1.5 mmol/L MgCl₂ 1 μl, Buffer缓冲液2 μl, 10 mmol/μl dNTP 0.4 μl, 10 pmol/μl引物P₁, P₂各0.8 μl, 5U/μl TaqDNA聚合酶0.3 μl,其余用双蒸水补足。PCR反应条件:预变性95℃ 5 min,变性95℃ 30 s,退火温度(57~60℃) 1 min,延伸至72℃ 1 min,共35个循环,最后72℃再次延伸2 min,4℃保存。设置对照及PCR扩增产物的检测:取扩增产物3 μl, Pg(ATCC33277), Aa(ATCC29523), Tf(ATCC 43037), Fn(ATCC25586), Pi(ATCC25611)标准株做阳性对照,不加任何模板的反应体系为空白对照。2 g/dl琼脂糖(0.5 mg EB/L)凝胶电泳,电压100V,以pUC19DNA/Mspl, DNA Marker DL 2000为标准对照,紫外线检测仪观察扩增带。

1.6 数据处理 采用PEMS统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本之间均数比较用 t 检验;组间比较用方差分析。 $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 洁悠神物理抗菌喷雾敷料处理前后龈下菌斑微生物检出结果($\bar{x}\pm s$, lg CFU/ml) 用药前($n=376$),需氧菌和厌氧菌分别为 $64.3\pm 6.1, 33.1\pm 3.6$;用药后($n=376$),需氧菌和厌氧菌分别为 $39.8\pm 6.4, 10.1\pm 4.4$ 。结果显示,在使用洁悠神物理抗菌喷雾敷料处理后无论是需氧菌还是厌氧菌差异都有统计学显著性意义($t_{需}=21.82, t_{厌}=32.19, P$ 值均 <0.05),均表现为用药后的菌落数明显减少。

2.2 儿童组与成年组两种方法的检出率 见表1。376例牙周病患者龈下菌斑中5种牙周炎相关致病菌PCR法和培养法的总检出率分别为Pg(40.96%, 17.82%), Tf(88.56%, 27.66%), Fn(81.91%, 23.67%), Pi(57.98%, 19.15%), Aa(19.15%, 9.31%),均表现为PCR法阳性检出率高于培养法,除Aa($P>0.05$)外,其余4种牙周炎相关致病菌 P 值均 <0.01 ,儿童组的检出率明显低于成人组($P<0.05$)。

表1 龈下菌斑中5种牙周炎相关致病菌PCR和培养法的检测结果

细菌种类	儿童组(n=70)				成年组(n=306)			
	PCR法		培养法		PCR法		培养法	
	株数	检出率(%)	株数	检出率(%)	株数	检出率(%)	株数	检出率(%)
牙龈卟啉单胞菌(Pg)	22	31.43	8	11.43	132	43.14	59	19.28
伴放线嗜血杆菌(Aa)	10	14.29	5	7.14	62	20.26	30	9.80
福赛斯坦纳菌(Tf)	48	68.57	15	21.43	285	93.14	89	29.08
具核梭杆菌(Fn)	44	62.86	13	18.57	264	86.27	76	24.84
中间普氏菌(Pi)	31	44.29	9	12.86	187	61.11	63	20.59

3 讨论 牙周炎的发病机制是近年来的研究热点,目前研究主要着重于包括牙龈卟啉单胞菌(*Prophomonas gingivalis*,Pg)、伴放线嗜血杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*,Aa)和福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*,Tf)等牙周可疑致病菌。在以往的牙周病原菌的研究中,由于难以培养,螺旋体很长时间一直没有受到应有的关注,近年来,聚合酶链和基因序列分析技术的发展应用,使得对牙周致病菌的研究摆脱了传统实验室培养的限制,16S rRNA 基因克隆技术通过扩增各种细菌共有基因序列片段,分析标本中的菌群结构,对实验室难以培养的细菌具有相同的检测效率,通过代表不同细菌种类的克隆子的数量计算各种细菌的相对数量,具有培养方法难以比拟的优势^[7]。

本研究中PCP法和培养法检出率最高的是Tf(88.56%,27.66%)和Fn(81.91%,23.67%)。Tf主要的外膜蛋白基因为pA基因,此基因由1419bp可读区与类似细菌脂蛋白的信号肽组成,其外膜成分通过黏附,定植于宿主组织起细胞毒作用,Tf还可以抑制T淋巴细胞的增殖和中性粒细胞产生过氧化物,导致宿主抗菌能力下降;Fn是口腔感染部位的优势菌,可与Pg,Tf,Aa,链球菌等混合感染中起协同作用。有学者认为Tf和Fn在牙周炎的慢性感染中起主要作用,并且与早发性牙周炎、急性坏死性牙龈炎,以及各种严重牙周损害的破坏性牙周病密切相关,其检测到的概率以及数量的多少可用作观察牙周疾病严重程度及监测治疗效果的指标^[8]。

本课题组前期研究已证实:洁悠神物理抗菌喷雾敷料对口腔癌瘤术后菌群具有抑制作用^[9]。本研究表明该敷料对牙周炎相关致病菌群同样具有明显的抑制作用并影响其分布,这是由于洁悠神敷料是高分子活性剂,其结构为“胶联层”和“正电荷层”复式叠加,能够在皮肤或黏膜表面敷着固化,形成分子级隐形抗菌敷料,因此独具长效抗菌性,

达到物理抗菌作用^[10]。

另外儿童组的检出率明显低于成人组的检出率,提示儿童患者中牙周炎的发病和进展可能有其特定的组织结构和细菌学病因,这有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lembariti BS, Mikx FH, van Palenstein H. Microscopic spirochete counts in untreated subjects with and without periodontal tissue destruction[J]. *J Clin Periodontol*, 1995, 22(3): 235-239.
- [2] Kimura S, Ooshima T, Takiguchi M, et al. Periodontopathic bacterial infection in childhood[J]. *J Periodontol*, 2002, 73(1): 20-26.
- [3] Ashimoto A, Chen C, Bakker I, et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 1996, 11(4): 266-273.
- [4] Elter JR, Champagne CME, Offenbacher S, et al. Relationship of periodontal disease and tooth loss to prevalence of coronary heart disease[J]. *J Periodontol*, 2004, 75(6): 782-790.
- [5] Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, et al. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial[J]. *Journal Periodont Res*, 2004, 39(6): 442-446.
- [6] 刘华, 钟良军, 李生彪, 等. 牙周致病菌在冠心病患者龈下菌斑中的分布[J]. *口腔医学研究*, 2008, 24(2): 141-142.
- [7] 张守印, 张集, 叶长芸, 等. 用16SrRNA基因克隆文库研究腹泻粪便中菌群分布[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(3): 165-166.
- [8] 闫福华, 郑瑜谦. 口腔螺旋菌与牙周炎[J]. *口腔医学研究*, 2008, 24(2): 121-123.
- [9] 符义富, 傅尧, 曾以周, 等. 洁悠神长效喷雾敷料抗菌作用的临床细菌学研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2008, 23(6): 88-89.
- [10] 邓润智, 符义富, 曾以周, 等. 洁悠神物理抗菌喷雾敷料对口腔癌瘤术后菌群的影响[J]. *口腔医学研究*, 2007, 23(5): 542-543.

收稿日期: 2008-11-28

修回日期: 2009-02-11