

[文章编号 1000-1182(2004)02-0126-03]

婴儿口腔早期定植菌群的一年动态观察

邹 静, 周学东, 李少敏

(四川大学华西口腔医院 儿童牙科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察婴儿口腔早期定植细菌的动态变化。方法 收集 12 例健康新生儿出生后第 1 天和 1、3、6、9、12 个月的口腔样本, 选择适当稀释度接种于 BA、MSA、BHI 培养基, 经需氧、微需氧及厌氧条件培养后行细菌形态学及生化鉴定。结果 婴儿口腔中检出率最高的细菌为 *S. salivarius*, 其次为 *S. mitis*; 乳牙萌出后 *S. sanguis*, *S. gordonii* 和 *S. mutans* 有一定的检出; *Veillonella spp.* 在出生后 1 月的新生儿口腔即有一定的检出, *A. odontolyticus* 在 3 个月时开始有 8.3% 的检出; *L. acidophilus* 在婴儿口腔一直维持在较低的检出水平; 少数有部分乳牙萌出的婴儿口腔中检出 *L. buccalis* 与 *Captocoryphaga spp.* 的存在。结论 *S. salivarius* 与 *S. mitis* 是新生儿及婴儿口腔的优势细菌, *Veillonella* 是最早、最常检出的厌氧菌, *A. odontolyticus* 是最早检出的放线菌, 随着婴儿月龄的增加, 其口腔中检出细菌的种类和数量均明显增加。

[关键词] 口腔细菌; 早期定植; 优势细菌

[中图分类号] R780.1 [文献标识码] A

Analysis of Oral Microflora Early Colonized in Infants ZOU Jing, ZHOU Xue-dong, LI Shao-min. (Dept. of Pediatric Dentistry, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe the dynamic changes of oral microflora early colonized in infants. **Methods** The oral swab samples for the study were taken in 1 day, 1, 3, 6, 9, 12 months after birth from 12 healthy neonates. By choosing suitable diluted concentration, the samples were incubated aerobically, facultative anaerobically and anaerobically. The strains were identified by observing colony characteristics, Gram staining and biochemical tests. **Results** *S. salivarius* was the most frequent microflora, followed by *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. gordonii* and *S. mutans* occurred in oral cavity after tooth eruption. *Veillonella spp.* can be detected in oral cavity of 1-month-old babies, *A. odontolyticus* was isolated from 8.3% infants of more than 3 months old. *L. acidophilus* maintained the lower prevalence in oral cavity of babies. *Leptotrichia buccalis* and *Captocoryphaga spp.* occurred in oral cavity of some dentate infants. **Conclusion** *S. salivarius* and *S. mitis* are predominant species in oral cavity of the infants, *Veillonella spp.* is the first and the most anaerobic species appeared in oral cavity of healthy babies. *A. odontolyticus* is the first actinomyces detected in oral cavity. With the increasing months, kind and amount of microflora increase dramatically.

[Key words] oral microflora; early colonized; predominant flora

婴儿口腔正常微生物群的建立及其演替与宿主的年龄、饮食习惯、口腔卫生习惯以及宿主父母口腔固有菌群有密切关系。随着宿主年龄的增加, 口腔由新生儿无牙口腔到乳牙的逐渐萌出和乳牙列的建立, 口腔微生物群也发生相应的改变。研究婴儿口腔中细菌的早期定植特点, 将有利于建立维持口腔微生态平衡的条件, 可以防止因平衡失调导致条件致病菌引起的感染性疾病的发生。本研究对健康婴儿口腔细菌的早期定植情况进行 1 年的追踪, 纵向观察人类口腔早期定植细菌的种类、数量及定植时间。

1 材料和方法

1.1 研究对象

2001 年 11~12 月在四川大学华西第二医院选择身体健康、无家族性疾病史、无感染性疾病、发育正常的 12 例健康婴儿为研究对象, 其中男 6 例, 女 6 例。

1.2 样本的收集和处理

1.2.1 婴儿口腔拭子的收集 对乳牙尚未萌出的婴儿用消毒棉拭子轻轻擦拭其颊黏膜、舌背及上下牙槽嵴, 取其口腔拭子; 对下颌乳中切牙已经部分萌出或全萌出的婴儿用无菌匙形器采集牙面菌斑。将取得的拭子或菌斑标本立即置于预先消毒灭菌、装有 1 ml pH 7.4 硫乙醇酸盐转送液的塑料离心管中备用。

1.2.2 样本收集时间 分别在婴儿出生后第 1 天和 1、3、6、9、12 个月收集口腔微生物样本, 收集前半小时不得进食。

[收稿日期 2003-05-28; 修回日期 2003-11-16]

[作者简介] 邹 静 (1970-), 女, 四川人, 副教授, 博士

[通讯作者] 邹 静, Tel: 028-85503527

1.2.3 样本的培养前处理 将样本经旋涡混匀仪振荡 1 min,使细菌团块分散均匀,用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释。

1.3 微生物的培养

1.3.1 培养基 Blood Agar (BA, Oxoid) 培养基; Mitis Salivarius Agar (MSA, Difco) 培养基; Brain Heart Infusion (BHI, Difco) 培养基。以上培养基均为成品培养基。

1.3.2 口腔细菌的培养 对无牙婴儿的口腔样本取原倍和 10^3 倍稀释液各 10 μ l 分别接种于 BA、MSA 和 BHI 培养基; 对下颌乳中切牙部分或全部萌出的婴儿菌斑样本取原倍和 10^2 倍稀释液各 10 μ l 接种于 BA、MSA 和 BHI 培养基。BA 培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 需氧培养 24 h; MSA 培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 微需氧培养 48 h; BHI 培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 48 h。

1.4 微生物的鉴定

1.4.1 细菌的形态学鉴定 取出培养皿, 观察各培养基上菌落生长情况, 挑选不同形态特点的单个菌

落, 涂片, 革兰染色, 镜检观察菌体形态。

1.4.2 细菌的生化鉴定 将具有典型菌落形态和菌体形态的单个菌落接种于 BHI 平板, 根据细菌所需要的不同生长条件, 分别在需氧、微需氧和厌氧条件下次代纯培养 48 h, 肉眼观察无杂菌生长, 镜检证实为纯培养后, 收集菌落作微量生化板法鉴定。

2 结 果

12 例健康婴儿口腔检出细菌的种类、数量及检出率的动态变化见表 1。从表 1 可见从婴儿口腔中分离培养出的细菌主要是口腔链球菌群 (*Streptococcus group*), 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、韦荣菌属 (*Veillonella*)、奈瑟菌属 (*Neisseria*)、放线菌属 (*Actinomyces*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium*)、颊纤毛菌 (*Leptotrichia buccalis*)、二氧化碳噬纤维菌属 (*Capnocytophaga*) 也可从婴儿口腔中检出。

表 1 12 例健康婴儿出生后口腔检出细菌的种类及数量 ($\bar{x} \pm s$, lg CFU/ml)

Tab 1 Components and amounts of oral bacteria in 12 healthy infants ($\bar{x} \pm s$, lg CFU/ml)

检出细菌	检出时间					
	第 1 天	第 1 月	第 3 月	第 6 月	第 9 月	1 岁
唾液链球菌 (<i>S. salivarius</i>)	4.25 \pm 0.25	6.19 \pm 0.33	5.09 \pm 0.10	4.69 \pm 0.27	4.19 \pm 0.26	3.60 \pm 0.15
轻链球菌 (<i>S. mitis</i>)	4.37 \pm 0.14	6.29 \pm 0.40	6.39 \pm 0.21	6.46 \pm 0.30	6.49 \pm 0.13	6.53 \pm 0.22
口腔链球菌 (<i>S. oralis</i>)	4.55 \pm 0.03	6.34 \pm 0.19	6.22 \pm 0.14	5.21 \pm 0.21	4.30 \pm 0.21	3.94 \pm 0.12
血链球菌 (<i>S. sanguis</i>)	0	0	0	2.14 \pm 0.00	3.60 \pm 0.28	4.35 \pm 0.23
哥登链球菌 (<i>S. gordonii</i>)	0	0	0	2.08 \pm 0.00	2.12 \pm 0.00	2.16 \pm 0.00
变形链球菌 (<i>S. mutans</i>)	0	0	0	0	2.26 \pm 0.00	2.76 \pm 0.02
表皮葡萄球菌 (<i>S. epidermidis</i>)	4.34 \pm 0.49	4.69 \pm 0.38	4.27 \pm 0.11	4.62 \pm 0.08	4.14 \pm 0.18	3.89 \pm 0.31
奈瑟菌 (<i>Neisseria spp.</i>)	0	4.93 \pm 0.35	4.61 \pm 0.19	4.52 \pm 0.16	4.36 \pm 0.10	4.13 \pm 0.24
韦荣菌 (<i>Veillonella spp.</i>)	0	5.78 \pm 0.40	5.24 \pm 0.25	4.96 \pm 0.32	4.48 \pm 0.14	4.12 \pm 0.36
嗜酸乳杆菌 (<i>L. acidophilus</i>)	3.39 \pm 0.22	0	3.20 \pm 0.00	3.41 \pm 0.02	3.18 \pm 0.00	3.08 \pm 0.06
梭杆菌 (<i>Fusobacterium spp.</i>)	0	0	2.24 \pm 0.00	2.89 \pm 0.13	3.28 \pm 0.24	3.66 \pm 0.17
二氧化碳噬纤维菌 (<i>Capnocytophaga</i>)	0	0	0	2.14 \pm 0.00	0	2.04 \pm 0.00
颊纤毛菌 (<i>L. buccalis</i>)	0	0	0	2.12 \pm 0.00	2.20 \pm 0.03	2.12 \pm 0.00
溶牙放线菌 (<i>A. odontolyticus</i>)	0	0	2.64 \pm 0.00	3.62 \pm 0.21	3.61 \pm 0.38	3.91 \pm 0.22

随着月龄的增加, 婴儿口腔中检出细菌的种类和数量均明显增加, 检出最多的细菌是 *S. salivarius*。该菌从新生儿出生后第 1 天起到婴儿期结束一直是检出最为频繁的细菌。*S. mitis* 在新生儿出生后第 1 天即有检出, 出生后 1 个月该菌的检出达到 81.8%, 此后其检出率一直维持在较高水平, 是新生儿及婴儿口腔的优势菌群。*S. oralis* 在乳牙萌出之前有一定的检出, 在乳牙萌出后该菌可以在超过半数以上的婴儿样本口腔中检出。在乳牙萌出前未能检测到 *S. sanguis*, *S. gordonii* 和 *S. mutans*; 在出生后 6 个月, *S. sanguis* 和 *S. gordonii* 开始检出; 出生后 12 个月, *S. sanguis* 的检出数量明显上升。

Neisseria spp. 在出生后 1 个月的新生儿口腔中即有检出, 以后随着婴儿月龄的增加, 其检出量缓慢上升。*Veillonella spp.* 在出生后 1 个月的新生儿口腔中有一定的检出, 在乳牙萌出后该菌的检出明显增加。*L. acidophilus* 在 3 个月大小的婴儿口腔开始检出, 其后该菌一直维持一个较低的检出水平。*S. epidermidis* 在新生儿出生后 1 月时达到检出高峰, 随着婴儿月龄的增加, 该菌的检出有所下降。在 3 个月时开始有婴儿口腔检出 *F. nucleatum* 和 *A. odontolyticus*, 6 个月和 12 个月时这两种菌均维持较低的检出量。乳牙萌出后, 少数婴儿口腔中检出 *L. buccalis* 与 *Capnocytophaga spp.* 的存在。

3 讨 论

本研究结果显示,在新生儿出生后的 1 年内,链球菌为口腔内的优势菌,其种类和数量随着婴儿月龄的增加呈上升趋势。在出生后第 1 天的新生儿口腔即可培养出 *S. salivarius*, *S. mitis* 和 *S. oralis*, 乳牙萌出后有 *S. sanguis*, *S. mutans* 和 *S. gordonii* 从婴儿口腔检出,说明前 3 种细菌属于口腔早期定植细菌(early colonizers),其存在不依赖于牙的萌出;*S. sanguis*, *S. mutans* 和 *S. gordonii* 属于口腔正常微生物中的晚期定植细菌(late colonizers),其存在依赖于乳牙的萌出,该结果与 Pearce 等¹ 的研究结果一致。*S. salivarius* 是本研究中检出率最高的一种口腔链球菌,说明 *S. salivarius* 对口腔黏膜具有较强的粘附能力。无牙婴儿的舌和咽部是 *S. salivarius* 在口腔定植的主要生态位,因而 *S. salivarius* 可成为婴儿口腔正常菌群的早期定植菌²。Kononen 等³ 的研究也显示,*S. mitis* 为婴幼儿口腔的主要优势微生物,*S. salivarius* 在婴儿期结束时达到最高检出率。

不同的研究对 *S. sanguis* 在口腔中早期定植的时间结论不同。在乳牙萌出之前 Tappuni 等⁴ 和 Pearce 等¹ 检测到 *S. sanguis*, 并认为 *S. sanguis* 可选择性粘附到口腔黏膜上皮,参与黏膜表面正常菌群的组成;然而 Caufield 等⁵ 研究发现,*S. sanguis* 在人类口腔中的早期定植依赖于乳牙的萌出,随着乳牙的不断萌出,*S. sanguis* 在口腔正常菌群中所占的比例才逐渐增加。笔者支持 Caufield 等学者的研究结论即 *S. sanguis* 在无牙婴儿口腔不能检出,随着乳牙萌出数目的增多,该菌的检出数量才明显增加。大多数研究认为 *S. mutans* 在人类口腔的早期定植依赖于乳牙的萌出,其“感染窗口期”为出生后 26 个月左右⁶,最早可在婴儿 10 个月左右检出该菌在口腔的定植⁷。本研究在婴儿 9 个月时有 1 例母乳喂养的婴儿口腔中检出了 *S. mutans*, 12 个月时该菌的检出有所上升,故笔者认为 *S. mutans* 在口腔的定植同样依赖于乳牙的萌出,依赖于口腔滞留区的出现和增加。*S. oralis* 在新生儿及婴儿口腔均有一定的检出,且乳牙萌出前后该菌的检出无明显差异,说明该菌在新生儿及婴儿口腔的定植不依赖于乳牙的存在。Frandsen 等⁸ 也发现,*S. oralis* 对婴幼儿的口腔黏膜有一定的粘附能力,在成年人的牙面少有此菌的存在。

早期的研究均认为在新生儿及 1 岁以下的婴儿口腔中厌氧菌仅为偶然检出,且数量很少,故认为其定植必须依赖于乳牙的萌出。近年来随着厌氧培养技术的进步,婴儿口腔中越来越多的厌氧菌被检测出来。本研究选用 BHI 非选择性厌氧培养基及厌氧培

养箱分析婴儿口腔中的厌氧菌定植情况,发现无牙婴儿口腔中主要的厌氧细菌为 *Veillonella*, *F. nucleatum* 与 *A. odontolyticus* 有较低的检出;随着乳牙的萌出,*Veillonella*, *F. nucleatum* 与 *A. odontolyticus* 的检出率均明显增加,成为婴儿口腔的优势厌氧细菌,少数样本还检出 *Capnocytophaga* spp. 及 *L. buccalis*, 这与 Kononen 的研究结果基本一致。Kononen⁹ 在研究中检出的 *P. melaninogenica* 和 *P. catoniae* 本研究未能检出,可能是本研究所涉及的样本量较小,培养基对 *Prevotella* 的选择性不够好的缘故。放线菌属于早期定植口腔的原籍微生物,*A. viscosus* 和 *A. naeslundii* 被证明与根面龋有关,*A. odontolyticus* 与乳牙龋的发生有关,并参与早期菌斑形成¹⁰。本研究结果显示,3 个月以后的所有婴儿口腔样本中可检出 *A. odontolyticus* 的存在,其检出不依赖于乳牙的萌出,本研究未检出与龋病密切相关的 *A. naeslundii* 和 *A. viscosus*。该结果与 Sarkonen 等¹¹ 的研究结果基本一致。

[参考文献]

- 1] Pearce C, Bowden GH, Evans M, et al. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates J. J Med Microbiol, 1995, 42(1): 67-72.
- 2] Smith DJ, Anderson JM, King WF, et al. Oral streptococcal colonization of infants J. Oral Microbiol Immunol, 1993, 8(1): 1-4.
- 3] Kononen E, Jousimies-Somer H, Bryk A, et al. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: Longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age J. J Med Microbiol, 2002, 51(9): 723-730.
- 4] Tappuni AR, Challacombe SF. Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults J. J Dent Res, 1993, 72(1): 31-36.
- 5] Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, et al. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: Evidence for a discrete window of infectivity J. Infect Immun, 2000, 68(7): 4018-4023.
- 6] Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: Evidence for a discrete window of infectivity J. J Dent Res, 1993, 72(1): 37-45.
- 7] Karn TA, O'Sullivan DM, Tinanoff N. Colonization of *mutans streptococci* in 8- to 15-month-old children J. J Public Health Dent, 1998, 58(3): 248-249.
- 8] Frandsen EV, Pedrazzoli V, Kilian M. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx J. Oral Microbiol Immunol, 1991, 6(3): 119-123.
- 9] Kononen E. Oral colonization by anaerobic bacteria during children: Role in health and disease J. Oral Diseases, 1999, 5(4): 278-285.
- 10] Liljemark WF, Bloomquist CG, Bandt CL, et al. Comparison of the distribution of *Actinomyces* in dental plaque on inserted enamel and natural tooth surfaces in periodontal health and disease J. Oral Microbiol Immunol, 1993, 8(1): 5-15.
- 11] Sarkonen N, Eronen E, Summanen P, et al. Oral colonization with actinomyces species in infants by two years of age J. J Dent Res, 2000, 79(3): 864-867.

(本文编辑 邓本姿)