

· 基础医学 ·

基于叠氮溴化丙锭结合高通量测序技术分析口腔综合治疗台水路系统中活菌多样性的研究

周如玉¹, 平逸帆^{1,2}, 张元^{1,3}, 王娟^{1,2*}

¹南京医科大学口腔疾病研究江苏重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科, ³正畸科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:利用叠氮溴化丙锭(propidium monoazid, PMA)预处理方法结合高通量测序技术检测口腔综合治疗台水路系统(dental unit waterline, DUWL)中活菌微生物群落,以综合评估不同科室DUWL中的污染情况及探究活菌群落构成的多样性。**方法:**选择南京医科大学附属口腔医院33台口腔综合治疗台,牙体牙髓病科23台(E组),牙周病科10台(P组),在医院开诊前收集三用枪水样, PMA预处理水样后提取活菌总DNA,经细菌通用引物PCR扩增后构建宏基因组文库,用于高通量测序和生物信息学分析。**结果:**样本使用1 μL PMA(最终浓度20 μmol/L)预处理10 min后暴露于卤素光照射5 min,最适合检测DUWL样品中活菌的量;高通量测序显示DUWL中活菌微生物群落呈多样性,并具有潜在的细菌致病序列。科室间具有统计学差异的菌门为蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、衣原体门(*Chlamydiae*)、*Aerophobetes*、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、*Bacteria_d_norank_k_unclassified_TM6* ($P < 0.05$);属水平上,军团菌属(*Legionella*)、*Methyloversatilis*、*Obscuribacterales_norank*差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**DUWL中致病微生物的存在对牙科医务工作者和患者都具有潜在感染风险,应重视DUWL细菌群落的多样性,有必要对DUWL进行定期水质控制。

[关键词] 叠氮溴化丙锭;高通量测序;口腔综合治疗台水路系统;微生物多样性

[中图分类号] R780.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)06-847-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20210609

Analysis on viable bacterial diversity in dental unit waterlines based on propidium monoazid in conjunction with high-throughput sequencing

ZHOU Ruyu¹, PING Yifan^{1,2}, ZHANG Yuan^{1,3}, WANG Juan^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Department of Endodontics, ³Department of Orthodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** In order to evaluate the microbial contamination of different departments and explore the diversity of living bacterial community, the method of propidium monoazid (PMA) pretreatment combined with high-throughput sequencing technology was used to detect the living microbial community in the dental unit waterline (DUWL). **Methods:** A total of 33 dental chair units (DCU) were selected from the Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, with 23 from endodontics department (group E) and 10 from periodontics department (group P). Before patients arrived, water samples were collected from each DCU using a three-in-one air/water syringe. After PMA pretreatment, the total DNA of living bacteria was extracted. After PCR amplification with bacterial universal primers, the macrogenomic library was constructed for high-throughput sequencing and bioinformatics analysis. **Results:** Samples were pretreated with 1 μL of PMA (20 μmol/L) for 10 min and subsequently exposed to light irradiation for 5 min, which were optimal for detecting viable bacterial in samples of DUWL. The output water of DUWL was associated with a high bacterial diversity and identified potential bacterial pathogenic sequence. The statistically different phyla between the two groups were *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Chlamydiae*, *Aerophobetes*, *Chloroflexi*, *Bacteria_d_norank_k_unclassified_TM6* ($P < 0.05$). The

[基金项目] 南京医科大学2017校基金(2017NJMU112);南京医科大学校基金(NMUB2019073)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: candy1249@126.com

statistically different genera between the two groups were *Legionella*, *Methyloversatilis*, *Obscuribacterales__norank* ($P < 0.05$).

Conclusion: The occurrence of potentially pathogenic microorganisms in these DUWLs demonstrated a potential infectious risk for both dental health care personnel and patients. Attention should be paid to the diversity of DUWL bacterial communities. It is necessary to proceed to regular water quality control of DUWLs.

[Key words] propidium monoazide; high-throughput sequencing; dental unit waterlines; diversity of microbial communities

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(06):847-855]

口腔综合治疗台水路系统(dental unit water-line, DUWL)是由相互连接的窄孔塑料管网组成,其输送的水既作为口腔设备的冷却剂,同时也作为口腔治疗期间的冲洗剂^[1]。DUWL的特殊结构为微生物的定植和生物膜形成提供了有利条件,已检测出细菌、真菌、病毒及原虫等多种微生物^[2-3]。口腔综合治疗台(dental chair unit, DCU)管道水中的微生物可通过口腔直接进入或气雾吸入等多种方式接触患者及牙科医务工作者。因此,口腔综合治疗台特定的部件及其中的微生物污染是导致交叉感染的可能来源。严重的微生物污染可能导致医务人员和患者出现健康问题,特别是免疫缺陷的患者^[4-5]。

2010年,Singh等^[6]报道南非的一名口腔医生可能由于职业因素经常暴露在被军团菌污染的气溶胶中而死于军团菌感染。2012年,Ricci等^[7]报道了一名健康的老年女性患者在接受口腔治疗后感染血清I型嗜肺军团菌而死亡。研究表明,DUWL中普遍存在一定的微生物污染^[8]。在DUWL出水中检测到内毒素浓度可达到 1×10^5 EU/mL,DUWL出水形成的气溶胶中也含有一定浓度的内毒素,平均浓度可以达 100 EU/m^3 ;且DUWL中细菌产生的内毒素极可能在口腔手术中刺激组织释放炎性细胞因子,进而不利于组织的创口愈合^[9]。

高通量测序技术已经成为微生态研究中较为先进的检查手段,能更准确地检测出环境样品中的细菌种类。但细菌死亡后数天乃至数周内其胞内DNA都能够保持相对完整,常规的分子生物学检测技术无法区分所扩增的核酸片段的模板DNA来自于活菌还是死菌,也就无法排除样本中死菌和游离DNA的干扰信息^[10]。如何使用高通量测序技术选择性地检测环境中的活性细菌群落的结构和多样性是本研究的目的。叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)是一种新型的核酸结合染料,能够穿过受损的细胞膜进入细胞内,在卤素光的作用下,PMA与胞内的DNA发生共价交联反应。同时,多余的游离PMA可在卤素光作用下与样本中的水进行交联反应

并失去活性。因此,可以利用PMA对活、死菌具有选择的特性,使死菌在DNA纯化过程中被剔除^[11]。

本研究将PMA与高通量测序技术相结合研究DUWL活菌微生物群落的构成和多样性,为后期研究提供参考依据,进而更好地评估DUWL水质污染的情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

封口膜(BEMIS公司,美国);R2A琼脂培养基(Oxoid公司,英国);PMA(Biotium,美国);细菌基因组DNA小量纯化试剂盒、rTaq DNA Polymerase(大连宝生物工程有限公司);AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒(Axygen公司,美国)。PMA溶解于无菌ddH₂O中,配制20 mmol/L PMA溶液-20℃避光保存。

1.1.2 实验仪器

口腔综合治疗台(Sinora公司,德国);需氧恒温细胞培养箱(Shellab公司,美国);超净工作台(苏州苏净安泰公司);台式冷冻离心机(Heraeus公司,德国);超微量紫外可见光光度计(GE公司,美国);GeneAmp 9700 PCR仪(ABI公司,美国);QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司,美国);Miseq高通量测序仪(Illumina公司,美国)。

1.1.3 研究样本

选择南京医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科及牙周病科DCU 33台,其中牙体牙髓病科23台(E组),标记为E1~E23;牙周病科10台(P组),标记为P1~P10。所有纳入研究的DCU均进行口腔常规门诊治疗超过3个月,且在取样前的1个月内未进行过管道维修。除此之外,排除在采样前3 d内接诊过有艾滋病、肝炎等传染病史患者的DCU。所有DCU的水路系统均连接过滤自来水作为水源水。

1.2 方法

1.2.1 水样采集

于当天上午8点开诊前采样,采样时严格执行

无菌操作,戴无菌手套手执三用枪枪柄,换上灭菌三用枪头,空放三用枪水流30 s,用灭菌瓶收集所需水样量,封口膜封口。采集另一椅位水样时更换另一灭菌过的三用枪头。所有水样立即送实验室进行下一步实验。

1.2.2 优化PMA前处理浓度

为确定在本研究中使用最佳PMA处理浓度,整个研究过程中分析的所有样本都按照相同的方法制备。根据前期实验检测的33台DCU水样结果,选择了污染最严重的7台DCU和污染最少的6台DCU作为研究对象。采集DUWL水样1 800 mL,在微生物实验室超净工作台中,涡旋震荡15 s后将样本平均分为9等份,每份200 mL。4 ℃ 6 000 r/min离心3 min,收集菌体沉淀,1 mL灭菌ddH₂O重悬,收集至1.5 mL灭菌EP管中。

取5份重悬菌体样本,85 ℃水浴10 min,冰上冷却10 min,重复1次。随机抽取其中1份样品,在超净工作台中,将热处理样本用接种环均匀涂布于R2A琼脂培养基,37 ℃恒温培养箱中培养6 d,用于验证热灭活细菌的效果。剩余4份样本分别标记为D1~D4。热处理样本(D1~D4)中加入PMA,使PMA的终浓度分别为0、5、10、20 μmol/L。未热处理的4份重悬菌体样本标记为L1~L4,也依次加入PMA,使PMA的终浓度分别为5、10、20、30 μmol/L。所有8份样本都混合均匀,避光静置处理10 min。样本置于冰上,使用500 W的卤素灯在距光源20 cm处光照5 min,光照交联时不断翻转样本,使其充分光照。PMA处理后的悬浮液于4 ℃ 12 000 r/min离心6 min,弃去上清液,使用细菌基因组DNA小量纯化试剂盒按说明书提取样本中的细菌基因组DNA。

PCR扩增目的片段:以提取的细菌基因组DNA为模板,采用细菌通用引物515F(5'-GTGCAGC-MGCCGCGG-3')及907R(5'-CCGTCAATTC-MTTTRAGTTT-3')对16S rRNA的V4~V5区进行扩增。

PCR扩增反应程序:95 ℃预变性3 min;;95 ℃变性30 s,55 ℃下退火30 s,72 ℃下延伸45 s,27个循环;最后在72 ℃条件下延伸10 min;4 ℃保存。PCR反应结束后,每管均加2 μL PCR产物用于1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,利用GelDoc2000凝胶成像系统观察琼脂糖凝胶上的DNA条带。

1.2.3 33个样本DNA提取、PCR扩增制备及高通量测序

最适PMA浓度预处理33个样本,DNA提取方法

同前。并通过 $D(260\text{ nm})$ 和 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 评估提取DNA的浓度和质量。PCR产物用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统进行检测定量。由上海美吉生物医药科技有限公司利用Illumina Miseq PE300平台进行高通量测序及数据分析。在各样本中的序列拼接一段barcode标签序列,用来区分样本来源的信息。有效序列是指获得的原始序列中具有完整的barcode标签序列。本次分析将barcode和前引物(forward primer)序列去除,过滤read尾部质量值20以下的碱基;拼接序列的overlap区错配比率不得高于20%;不允许barcode错配;引物错配数不得大于2。然后对有效序列进行数据优化及长度分布统计。

1.3 统计学方法

通过Usearch软件平台(version 7.1, <http://drive5.com/uparse/>)在97%的相似水平下对非重复序列(剔除单序列)进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)聚类;使用R软件绘制稀释曲线及Alpha多样性指数,采用Wilcoxon秩和检验进行组间差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

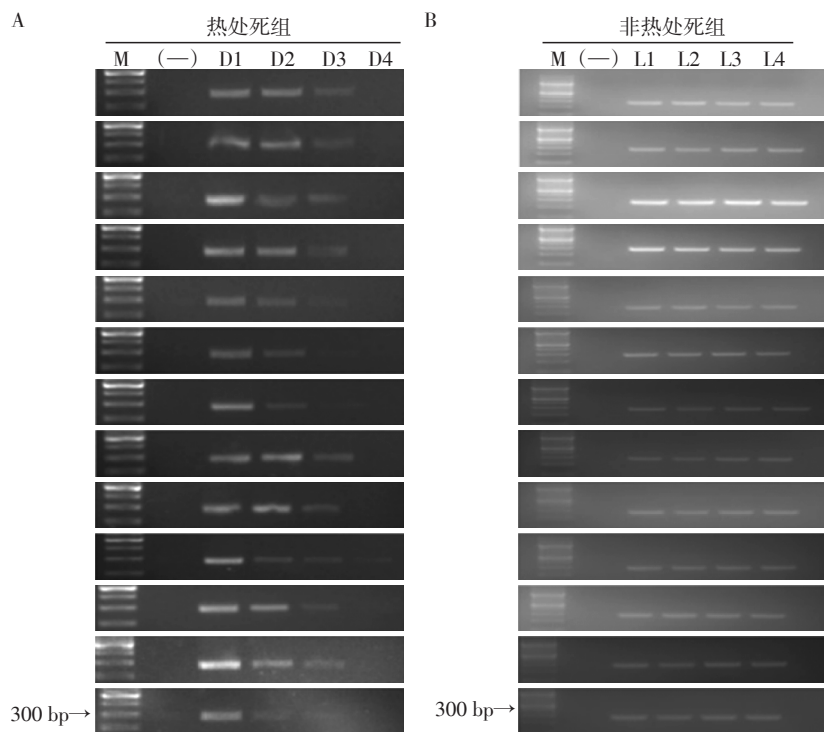
2.1 PMA最适浓度筛选结果

接种于R2A琼脂培养基的热处理样本,37 ℃培养6 d,未见菌落形成,证明热处理能有效杀死样本中的活菌。由图1A可知,对于热处理组水样,随着PMA浓度的增加,条带逐渐变暗,PMA终浓度为20 μmol/L时,条带完全消失。说明PMA能够与样本中死菌DNA发生反应并抑制其进行PCR扩增,终浓度20 μmol/L的PMA能够有效阻止所有死菌DNA的PCR扩增。由图1B可知,对于未进行热处理的常规水样,随着PMA浓度的增加,条带未见明显变暗或消失。说明对于常规水样,即使增加PMA浓度至30 μmol/L也不会影响正常活菌的PCR扩增。由此确定PMA处理DUWL水样的最适浓度为20 μmol/L。在这一浓度作用下,PMA不影响活菌DNA的PCR扩增,同时保证能抑制样本中死菌DNA的PCR扩增。

2.2 Miseq测序检测结果

2.2.1 样本测序结果及多样性指数

33个样本中共获得序列数1 216 470条,检测序列的质量及嵌合体,并比对Silva数据库,得到978 054条高质量序列。剔除barcode标签序列和前引物序列获得的序列平均长度为396 bp。



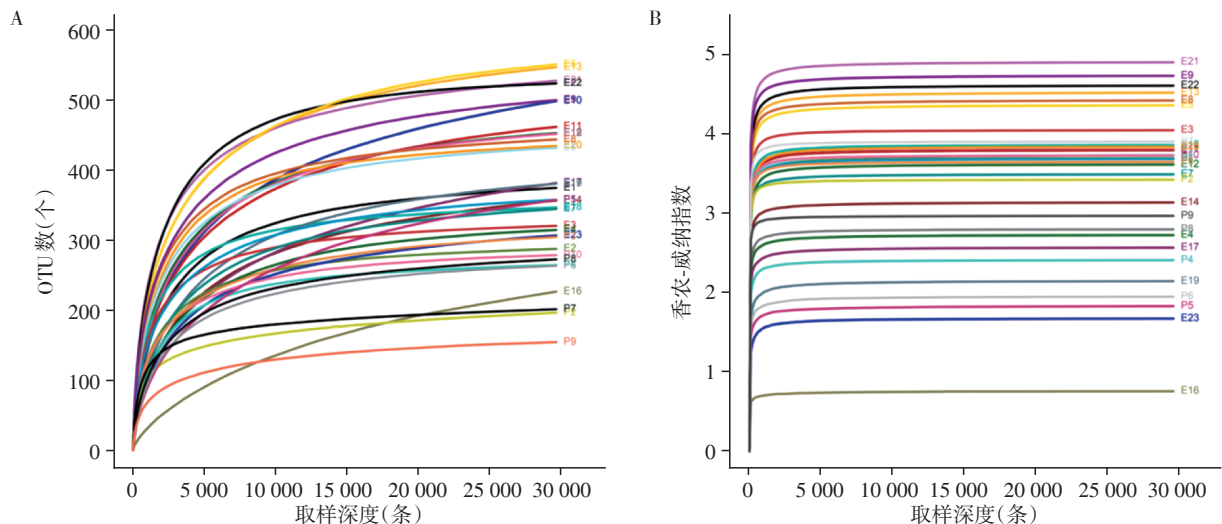
M:200 bp DNA ladder Marker; (—)为空白对照;A:热处理死组中D1~D4的PMA终浓度依次为0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$;B:非热处理死组L1~L4的PMA终浓度依次为5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 。

图1 PMA-PCR扩增结果
Figure 1 Results of PMA-PCR amplification

稀释曲线表明在5 000条序列前,OTU 数量随序列数增加大幅增加;在5 000~15 000条序列时,OTU 数量的增加趋于平缓;25 000条序列后,各组的OTU 数量进入平台期,OTU 量基本达到饱和(图2A)。香农-威纳(Shannon-Wiener)曲线则显示随着测序量的增加,香农-威纳指数(Shannon-Wiener di-

versity index)不断增大;当测序值达到5 000 以上后,各组曲线均进入了平台期(图2B)。

33 组的平均测序覆盖深度(Coverage 指数)均大于99.67%,表明测序数据量合理,且间接反映了物种的丰富度,即样本的当前测序深度足够反映该群落样本所包含的微生物多样性,可以进入下一步分析。



A:33个样本的稀释曲线;B:33个样本的香农-威纳曲线。以3%的基因距离为阈值。

图2 样本测序结果及多样性指数
Figure 2 Sample sequencing results and diversity index

OTU水平、Coverage指数、Shannon指数、丰富度指数等多样性统计指数提示DUWL中存在丰富的细菌群落构成和多样性(图3)。E组物种丰度指数(Chao、Ace值)显著高于P组,差异有统计学意义($P < 0.001$);物种多样性指数(Simpson、Shannon)显示两组之间差异没有统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.2 微生物群落组成分析

微生物门分类分析:从门的分布水平看(图4),在所有序列中,变形菌门(*Proteobacteria*)(56.71%)是相对丰度占比最高的门类,其次是厚壁菌门(*Firmicutes*)(16.89%)、异常球菌-栖热菌门(*Deinococcus-Thermus*)(10.36%)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)(3.10%)、浮霉菌门(*Planctomycetes*)(2.78%)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)(2.11%)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)(1.45%)、衣原体门(*Chlamydiae*)(1.20%)、放线

菌门(*Actinobacteria*)(1.13%)。以上菌门在33个样本中检出率为100%

微生物属分类分析:从属的分布水平看(图5),相对丰度较高的菌属有栖热菌属(*Thermus*)(10.32%)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)(10.19%)、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)(7.04%)、军团菌属(*Legionella*)(6.09%)、厌氧芽孢杆菌属(*Anoxybacillus*)(5.95%)、新鞘氨醇杆菌属(*Novosphingobium*)(4.62%)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)(4.35%)、*Reyranella*(2.94%)、*Obscuribacterales_norank*(2.56%)、肠球菌属(*Enterococcus*)(2.34%)、*Methyloversatilis*(1.73%)、全孢菌属-未培养(*Holosporaceae_uncultured*)(1.44%)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)(1.33%)、浮霉状菌科-未培养(*Planctomycetaceae_uncultured*)(1.30%)、水杆菌属(*Aquabacterium*)(1.12%)、亚硝化单胞菌科-未培

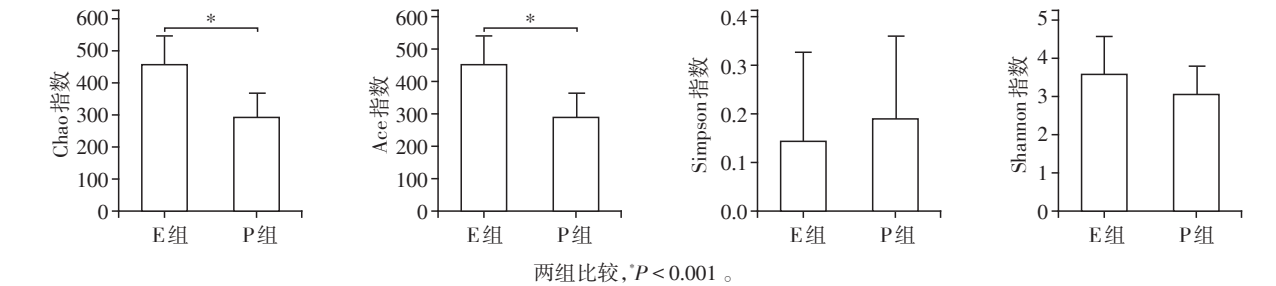


图3 两组Alpha多样性分析
Figure 3 Alpha diversity analysis of the two groups

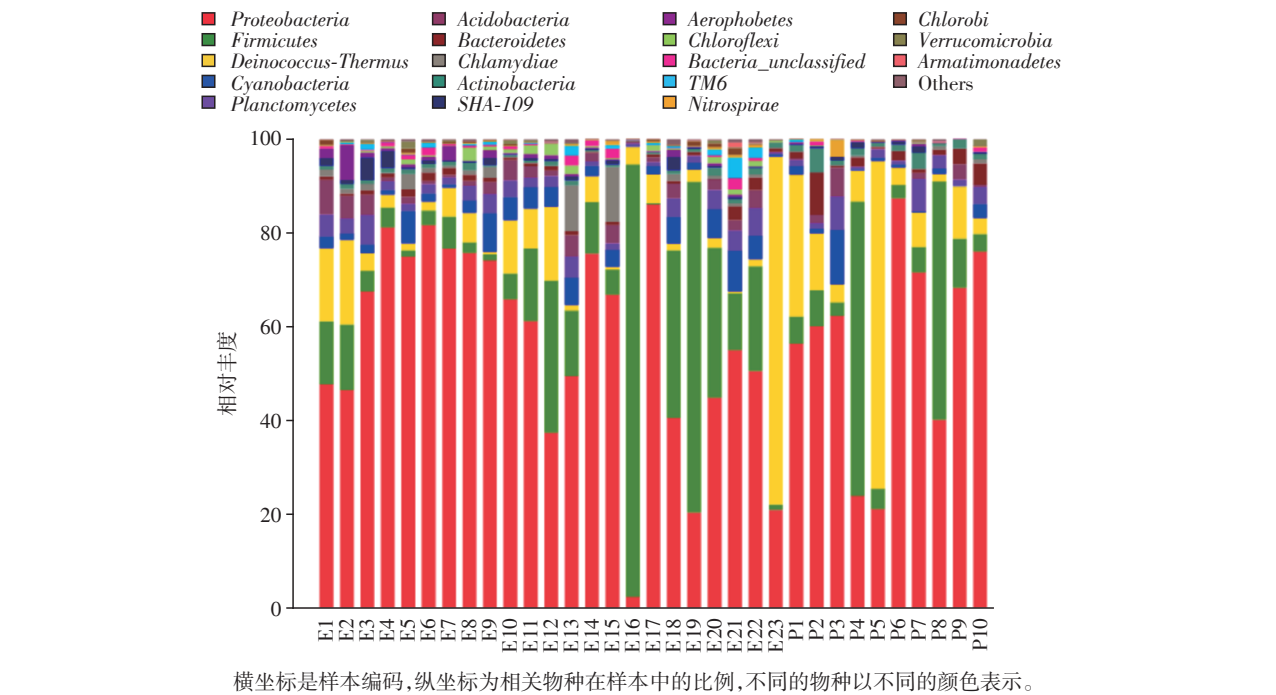
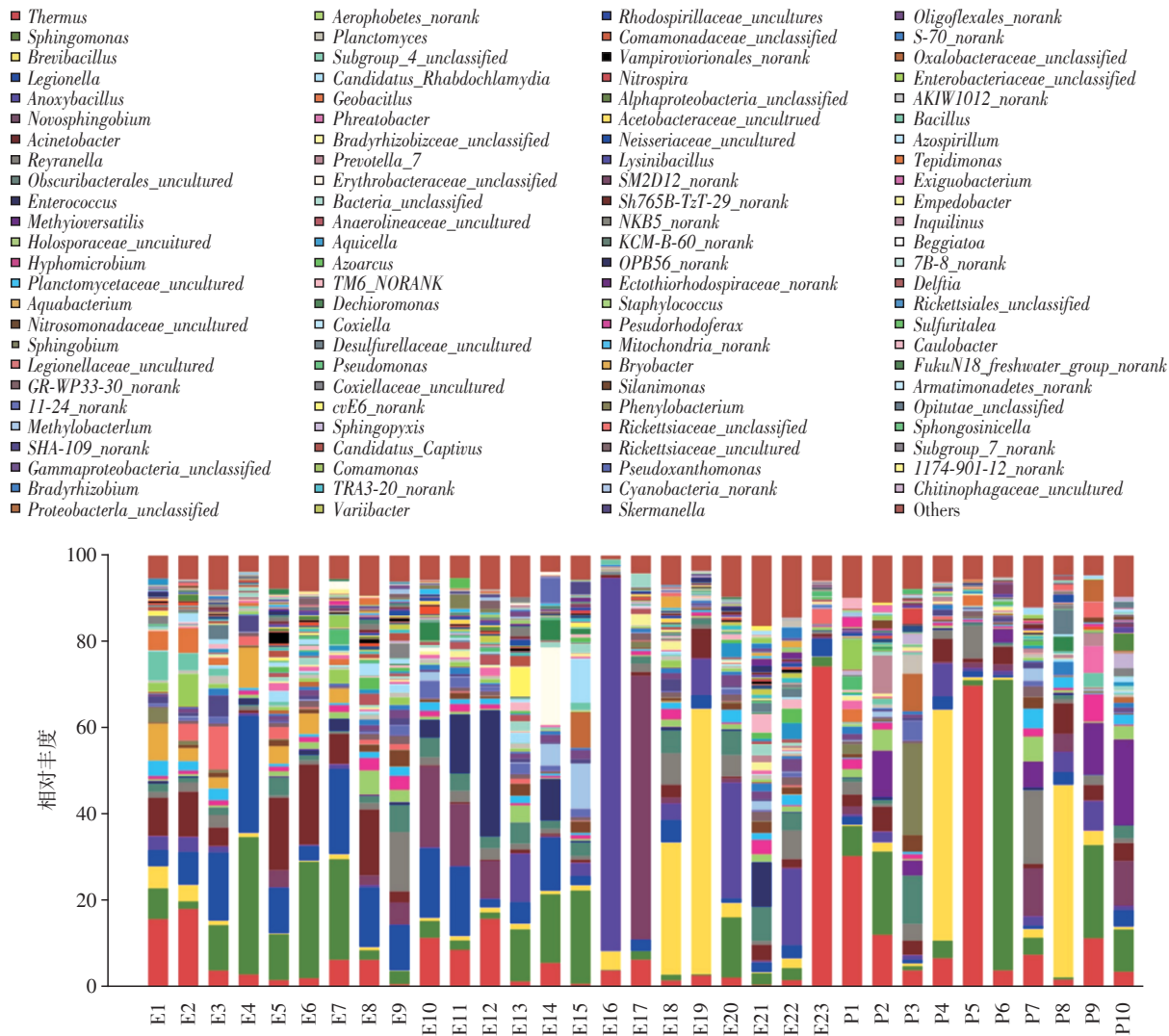


图4 E组和P组33个样本菌群在在门水平上的分类
Figure 4 Dominant bacterial communities at the phylum level of 33 samples from E group and P group

养 *Nitrosomonadaceae_uncultured* (1.05%)、鞘脂菌属 *Sphingobium* (1.01%)。以上菌属在33个样本中检出率为100%。33个样本检测出了4种条件致病菌属：军团菌属、不动杆菌属、肠球菌属、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (0.44%)，检出率为100%。E组共检

测出81个菌属，有8.73% (59 514/681 674)的序列不能被归为任何菌属；P组共检测出54个菌属，有11.05% (32 739/296 380)的序列不能被归为任何菌属，故只能在更高一级的分类水平中进行分析。

组间门、属分类差异性分析：基于群落丰度数



横坐标是样本编码，纵坐标为相关物种在样本中的比例，不同的物种以不同的颜色表示。

图5 E组和P组33个样本菌群在属水平上的分类

Figure 5 Dominant bacterial communities at the genus level of the 33 samples from E group and P group

据对E组和P组群落门、属分类水平显著性差异进行检验，运用Wilcoxon秩和检验方法分析可以检测到组间微生物群落中丰度具有差异性的物种。由图6可见E组与P组样本中检出的菌门，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 的为蓝藻菌门 (*Cyanobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、衣原体门 (*Chlamydiae*)、*Aerophobetes*、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、*Bacteria_d_norank_k_unclassified*、TM6；属水平上，军团菌属 (*Legionella*)、*Methyloversatilis*、*Obscuribacteria*、

les_o_norank 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

物种主坐标分析：基于unweighted Unifrac距离进行物种主坐标分析，PCoA图是根据方差分解将每个样本群落之间的差异通过二维坐标图反映出来，坐标图中的1个点代表1个样本信息，两个点之间的距离越近，表明两者之间的组成差异越小。第1主成分对样品差异的解释率为26.73%，第2主成分对样品差异的解释率为7.59%。从图7可知E组样本 (18/23) 聚集在一起，P组样本 (9/10) 聚集在一起，

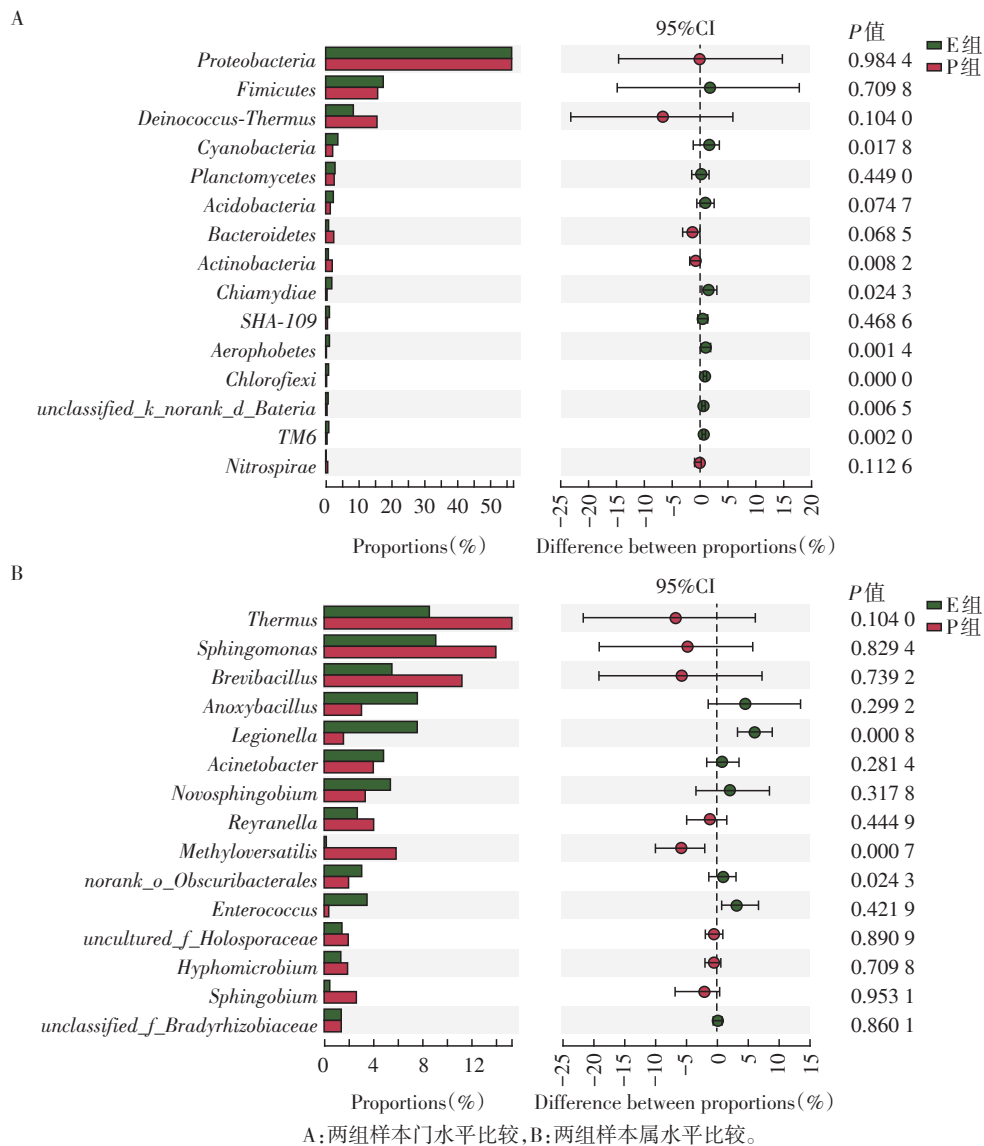


Figure 6 Differences in species abundance at phylum level and genus level between the two groups

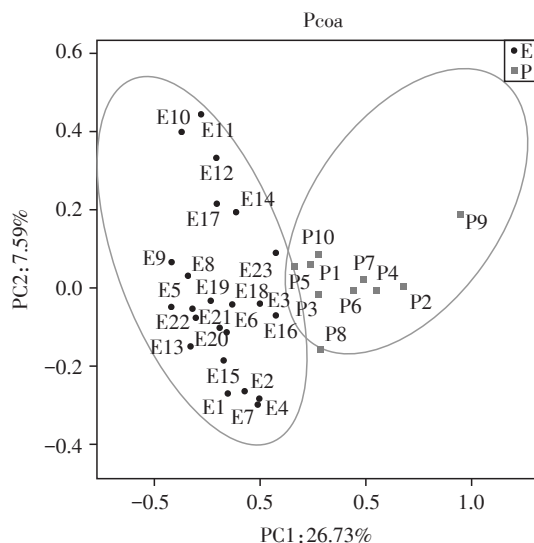
并且这两组样本在PCoA的横轴上被区分,形成了两个单独的集群。这表明两组样本组内群落间的相似性较高,而这两组样本组间的群落组成存在轻微差异性。

3 讨论

通过PMA预处理方法与Miseq高通量测序技术检测了33台DUWL水样中活菌群落构成和多样性,研究表明,DUWL中微生物群落多样性的信息要比以往研究结果丰富,且检出的细菌种属类别也远远高于以往的检测方法^[12]。33台DUWL样本中共得到978 054条优质序列,两组共有的OTU为753个,检测的共有优势菌门及共有较高丰度的菌属是DUWL中的共有核心微生物,其中一些细菌属序列仅

存在E组或P组。Miseq测序结果中未被分类或是尚未被培养出的菌属约占检出菌属的50%,这些都是以往研究中未能培养出的或者未知的种属。在本研究中,所有样本均检测出了4种条件致病菌属:军团菌属、不动杆菌属、肠球菌属、假单胞菌属,检出率为100%。Göksay等^[13]曾对土耳其伊斯坦布尔市的59个DUWL水样进行了细菌培养,仅在其中的14个样品中检测出了假单胞菌,检出率为24%。我们前期也对条件致病菌进行培养研究,采用CFC假单胞菌琼脂培养基对科室25个DUWL水样进行了细菌培养,在不同浓度条件下均未检出假单胞菌,在成功完成高通量测序的16个样本中均检测到了假单胞菌属的存在,丰度0.52%~8.32%不等^[14]。

军团菌属和假单胞菌属这两种常见的条件致



横、纵坐标为引起样品间差异的两个最大特征,以百分数的形式体现主要影响程度。

图7 各样本微生物群落差异性PCoA分析

Figure 7 PCoA analysis of the differences of microbial community among samples

病菌在每个样本中均可被检出,且军团菌属的检出丰度高于假单胞菌属。由此可推测军团菌属和假单胞菌属在DUWL中普遍存在。德国饮用水条例和医院卫生感染预防委员会要求所有DUWL中的军团菌浓度 <100 CFU/100 mL,总菌落计数 <100 CFU/mL。尤其当免疫受损的患者接受治疗时,DUWL的输出水中不能检测出铜绿假单胞菌、隐孢子虫和军团菌。为保持DUWL水质,建议DUWL供水只能使用饮用水或无菌水^[4]。文献报道导致健康人发生感染的铜绿假单胞菌浓度需大于 1.5×10^6 CFU/mL^[15],而Jensen等^[16]提出频繁的牙科治疗才可能导致感染风险显著增高。本研究中军团菌属、假单胞菌属占总体群落的相对丰度并不高,含量远小于致病量,DUWL中的军团菌属和假单胞菌属可能大多数处于活的非可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态。因此,健康人群在接触DUWL水后受到军团菌属及假单胞菌属感染的可能性极低,且临床上尚未有大规模的医源性感染暴发。

2015年,Costa等^[17]采用454焦磷酸测序技术检测法国普瓦捷市7个DUWL水样的细菌多样性及确定其潜在的细菌致病序列,该研究共检出394个属水平序列。其中条件致病菌属中军团菌属的丰度与本研究的丰度较为相似,假单胞菌属略高于本研究的丰度。但在细菌群落构成上与本研究存在较大差异,多样性和丰富性远远高于本研究结果。导致研究差异的原因可能为:①DUWL中出水的水质

受到供水水源、椅位使用率、接诊患者数量和类型的影响。中国和法国市政供水的水质不同。且与法国相比,中国的椅位使用率更高,每日接诊患者量更多,接诊患者口腔卫生状况有差异,这些都可能是导致研究结果中群落构成差异的原因。②Costa的研究中检出的多样性和丰富性不能排除死菌和游离DNA的信息,而本研究用PMA进行预处理,仅对活菌的群落构成进行检测,因而导致样本多样性较低。

PCoA结果表明E组和P组间微生物群落构成的相似性较低,而各组组内微生物群落之间的相似性较高。两个科室虽然都是通过市政供水,但考虑到牙体牙髓病科室可能使用高速及低速手机的频率较牙周病科室高,DCU回吸患者口腔中液体的概率较大^[18],可能导致其DUWL管道内微生物种类较牙周病科多。且两个科室诊治的疾病不同,牙体牙髓病科主要是针对龋病、牙髓病及根尖周病的治疗,主要致病菌为变形链球菌、放线菌、乳酸杆菌等;牙周病科主要治疗牙龈炎、牙周炎等,主要致病菌为伴放线放线杆菌、福赛坦氏菌、牙龈卟啉单胞菌这些厌氧菌和兼性厌氧菌。

此外,在33台DUWL中均发现了与饮用水中相同的细菌菌门,可能与本研究中DUWL的供水来自市政供水系统有关^[19]。以往研究也表明变形菌门是DUWL中最普遍的细菌菌门,大约占总序列的60%以上,与本研究结果相似^[2]。变形菌门通常在饮用水系统中检测到,相对丰度最高,可能是因为与其他菌门相比对氯具有更好的耐受性。因此,本研究认为水源水质状况可能是导致不同地区DUWL细菌群落差异的原因之一,这种差异性还可能与科室间及椅位间的使用情况、牙科设备或水路系统中管道的安装及水路系统中存在多样化的环境等因素有关。

DUWL管道狭长,内壁粗糙,近管壁处的水流流速缓慢,且大部分时间管道内水流都处于停滞状态,水中的微生物易于沉积附着于管壁,这是DUWL污染严重的一个重要原因^[3]。严重污染的管道水中基线水平细菌总数(total viable counts, TVC)可为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ CFU/mL,本课题组前期实验测得南京地区自来水中TVC为 (33.33 ± 22.31) CFU/mL。为控制DUWL污染现状,国内外学者进行了大量研究,提出多种改善DUWL供水质量、减少交叉感染的措施。课题组前期实验中使用臭氧水消毒机,采用低压电解原理,通过导电纳米金刚石瞬间将水电解为高浓度臭氧水,工作时不受环境和温度的影响,产

物不含氮氧化物,无致癌物质,为目前制备医用臭氧水领域最快速、便捷、安全的新技术^[20]。前期实验目的是观察DUWL经臭氧水溶液处理后的水质是否和国际要求相符,本研究结果为后续进一步探究臭氧水溶液对于DUWL中具体致病菌及未获培养微生物的影响提供了理论依据。

本研究结果有助于更好地了解DUWL中微生物群落活菌构成及与牙科治疗相关的潜在传染性风险,且更好地管理DUWL水质。综上所述,DUWL微生物致病菌的检测对医院感染安全监测至关重要。建立一种可靠的微生物群落活菌检测方法不仅能较准确地提供DUWL中微生物群落的信息,同时也可以为疾病预防、治疗和风险评估提供依据。对制定适应我国国情的口腔科用水标准、评估消毒方法的有效性、减少院内感染和预防相关疾病也有着重要的指导意义。虽然因检测费用昂贵,研究的样本数量有限,但本研究结果仍表明,应定期监测DUWL水质,并采取预防措施以防微生物污染。

[参考文献]

- [1] 平逸帆,张元,王娟,等.牙科综合治疗台水路微生物污染及防治[J].口腔医学,2016,36(7):657-661
- [2] SPAGNOLO A M, SARTINI M, CRISTINA M L. Microbial contamination of dental unit waterlines and potential risk of infection: a narrative review[J]. Pathogens, 2020, 9(8):651
- [3] O'DONNELL M J, BOYLE M A, RUSSELL R J, et al. Management of dental unit waterline biofilms in the 21st century[J]. Future Microbiol, 2011, 6(10):1209-1226
- [4] ARVAND M, HACK A. Microbial contamination of dental unit waterlines in dental practices in Hesse, Germany: A cross-sectional study[J]. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2013, 3(1):49-52
- [5] SZYMAŃ S J, SITKOWSKA J, DUTKIEWICZ J. Microbial contamination of dental unit waterlines[J]. Ann Agric Environ Med, 2008, 15(2):173-179
- [6] SINGH T S, BELLO B, MABE O D, et al. Workplace determinants of endotoxin exposure in dental healthcare facilities in South Africa[J]. Ann Occup Hyg, 2010, 54(3):299-308
- [7] RICCI M L, FONTANA S, PINCI F, et al. Pneumonia associated with a dental unit waterline[J]. Lancet, 2012, 379(9816):684
- [8] 张元,平逸帆,时玉洁,等.影响口腔综合治疗台管道水质的相关因素研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(7):846-849
- [9] BARBOT V, ROBERT A, RODIER M H, et al. Update on infectious risks associated with dental unit waterlines[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(2):196-204
- [10] NOCKER A, SOSSA-FERNANDEZ P, BURR M D, et al. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(16):5111-5117
- [11] HEIN I, SCHNEEWEISS W, STANEK C, et al. Ethidium monoazide and propidium monoazide for elimination of unspecific DNA background in quantitative universal real-time PCR[J]. J Microbiol Methods, 2007, 71(3):336-339
- [12] LISBOA G M, LISBOA Y R, PINHEIRO T M, et al. Microbial diversity in dental unit waterlines[J]. Acta Odontol Latinoam, 2014, 27(3):110-114
- [13] GÖKSAY D, COTUK A, ZEYBEK Z. Microbial contamination of dental unit waterlines in Istanbul, Turkey[J]. Environ Monit Assess, 2008, 147(1/3):265-269
- [14] 周如玉,平逸帆,张元,等.口腔综合治疗台水路系统中假单胞菌属污染状况的检测[J].南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(4):452-457
- [15] MARTIN M V. The significance of the bacterial contamination of dental unit water systems[J]. Br Dent J, 1987, 163(5):152-154
- [16] JENSEN E T, GIWERCMAN B, OJENIYI B, et al. Epidemiology of pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis and the possible role of contamination by dental equipment[J]. J Hosp Infect, 1997, 36(2):117-122
- [17] COSTA D, MERCIER A, GRAVOUIL K, et al. Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in dental unit waterlines[J]. Water Res, 2015, 81(sep.15):223-231
- [18] WALKER J T, MARSH P D. Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants[J]. J Dent, 2007, 35(9):721-730
- [19] HOLINGER E P, ROSS K A, ROBERTSON C E, et al. Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology[J]. Water Res, 2014, 49:225-235
- [20] 孙荣,王娟,梅予锋.臭氧水溶液对口腔综合治疗台管道的消毒效果[J].口腔医学,2020,40(6):521-525

[收稿日期] 2020-04-01