

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.003

· 基础研究 ·

牙周炎患者龈下菌斑菌群的高通量测序分析

杨万娟, 徐杰

昆明医科大学附属口腔医院牙周病科, 云南 昆明(650106)

【摘要】 目的 利用高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)分析广泛型侵袭性牙周炎(generalized aggressive periodontitis, GAgP)和重度慢性牙周炎(severe chronic periodontitis, SCP)龈下菌群的组成,利用生物信息学分析其多样性及功能,并观察牙周基础治疗前后龈下菌群的变化。方法 选择2018年9月至2019年5月在昆明医科大学附属口腔医院牙周病科就诊的11例GAgP患者和14例SCP患者作为研究对象。在基线及牙周基础治疗后第6周采集龈下菌斑样本并提取DNA,进行MiSeq测序,采用QIIME(quantitative insights in microbial ecology)、Mothur及SPSS等软件分析群落信息,并进行LEfSe差异分析(linear discriminant analysis Effect size, LEfSe)、Network网络分析,使用KEGG PATHWAY数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)对群落功能进行预测。结果 基线时,GAgP和SCP患者的优势菌群相似,均包括拟杆菌门、卟啉单胞菌属和牙髓卟啉单胞菌等。治疗后第6周,GAgP和SCP患者菌群变化相似,由于牙周袋变浅,拟杆菌门、卟啉单胞菌属和牙髓卟啉单胞菌等革兰阴性菌相对丰度降低,变形菌门、放线菌属和空间罗氏菌等革兰阳性菌相对丰度增加;其中放线菌是GAgP治疗后龈下菌群中显著增加的生物标志物;链球菌属是联系牙周炎相关菌属和牙周健康相关菌属的重要菌属。群落功能预测表明基础治疗可降低GAgP和SCP患者群落中的氨基酸代谢、甲烷代谢和肽酶等功能。结论 GAgP和SCP患者的龈下菌群相似,链球菌属作为早期定植菌,在龈下菌群由健康向失调转变的过程中可能发挥着促使菌斑生物膜形成及成熟的重要作用;牙周基础治疗可以改变GAgP和SCP患者龈下菌群的组成和结构,降低群落多样性,降低氨基酸代谢、甲烷代谢和肽酶等群落功能。

【关键词】 广泛型侵袭性牙周炎; 重度慢性牙周炎; 龈下菌斑; 龈下菌群; 牙周基础治疗; 高通量测序; 群落多样性; 群落功能预测

【中图分类号】 R781.4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)03-0157-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 杨万娟,徐杰.牙周炎患者龈下菌斑菌群的高通量测序分析[J].口腔疾病防治,2021,29(3):157-165. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.03.003.

High-throughput sequencing analysis of the microbiota of subgingival plaque in patients with periodontitis

YANG Wanjuan, XU Jie. Department of Periodontics, Stomatological Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650106, China

Corresponding author: XU Jie, Email: 14799731@qq.com, Tel: 86-13888161027

【Abstract】 Objective To detect the composition of the subgingival microbiota in generalized aggressive periodontitis (GAgP) and severe chronic periodontitis (SCP) patients tested by high-throughput sequencing (HTS) technologies, analyze its diversity and function by using bioinformatics, and observe changes in the subgingival microbiota before and after periodontal initial therapy. **Methods** Eleven patients with GAgP and 14 patients with SCP who visited the Department of Periodontics in Stomatological Hospital of Kunming Medical University from September 2018 to May 2019 were recruited, and subgingival plaque samples were collected at baseline and 6 weeks after initial therapy. Then, the genomic DNA was extracted and sequenced by the Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform. QIIME (quantitative insights in microbial ecology), Mothur, SPSS and other software were used to analyze community information. LEfSe

【收稿日期】 2020-04-24; **【修回日期】** 2020-05-30

【基金项目】 云南省科技厅科技计划项目(2018FE001[-261]); 云南省卫生科技计划项目(2017NS267)

【作者简介】 杨万娟,住院医师,硕士研究生在读,Email: 2809688235@qq.com

【通信作者】 徐杰,主治医师,博士研究生在读,Email: 14799731@qq.com, Tel: 86-13888161027

difference analysis (linear discriminant analysis effect size), network analysis, and the KEGG PATHWAY database (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) were used to predict community function. **Results** At baseline, the dominant microbiota of GAgP and SCP patients were similar, including Bacteroidetes, Porphyromonas and *Porphyromonas endodontalis*. Six weeks after initial therapy, as the periodontal pocket became shallower, the variation trend of the microbiota of GAgP and SCP patients was similar. The relative abundance of gram-negative bacteria, such as Bacteroidetes, Porphyromonas and *Porphyromonas endodontalis*, decreased, while the relative abundance of gram-positive bacteria, such as Proteobacteria, Actinomyces and *Rothia aeria*, increased. Actinobacteria were significantly increased biomarkers of the subgingival microbiota in GAgP after treatment. Streptococcus is an important genus that connects the microbiota related to periodontitis and the microbiota related to periodontal health. Community function prediction result showed that initial treatment can reduce the functions of amino acid metabolism, methane metabolism, and peptidase in GAgP and SCP patients. **Conclusion** The subgingival microbiota of GAgP and SCP patients are similar. Streptococcus, as an early colonizer, may play an important role in promoting plaque biofilm formation and maturation in the process of subgingival flora from health to imbalance. Initial therapy can change the composition and structure of the subgingival microbiota, reduce community diversity, and reduce the functions of amino acid metabolism, methane metabolism, and peptidase in GAgP and SCP patients.

【Key words】 generalized aggressive periodontitis; severe chronic periodontitis; subgingival plaque; subgingival microbiota; periodontal initial therapy; high-throughput sequencing; community diversity; community function prediction

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(3): 157-165.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Science and Technology Planning Project of Yunnan Science and Technology Department (No. 2018FE001[-261]), Health Science and Technology Project of Yunnan Province (No. 2017NS267).

常见的牙周炎有慢性牙周炎(chronic periodontitis, CP)和侵袭性牙周炎(aggressive periodontitis, AgP)等。当CP发展至重度慢性牙周炎(severe chronic periodontitis, SCP)时,牙周支持组织破坏严重,并伴有多种并发症;广泛型侵袭性牙周炎(generalized aggressive periodontitis, GAgP)患者由于病程进展快,就诊时通常也存在严重的牙周支持组织破坏,伴多种并发症;临床表现的相似性使SCP和GAgP在鉴别诊断方面存在一定的局限性。

牙周炎是感染性疾病,随着牙周炎的进展,龈下菌群的多样性也会增加^[1-2]。因此菌斑生物膜中相关微生物的检测是研究病因学的重要手段^[3]。常见的牙周微生物检测技术包括细菌培养法、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及DNA探针等技术。它们能对牙周致病菌进行定性及定量研究,但是能一次性同时检测的细菌数量有限,在菌群研究方面存在局限性。

近年来,研究者将高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术用于牙周炎相关微生物的研究,并取得了一定的进展。该技术能够进行大规模并行测序,具有高通量、高效率和高准确度的优势,能够对牙周微生物群落的组成、多样性、菌群

关系及群落功能等多方面信息展开研究^[4]。因此本研究选择以GAgP与SCP患者为研究对象,利用HTS检测上述两种疾病龈下菌群的组成和多样性等信息,并观察基础治疗前后两者龈下菌群的变化。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择2018年9月至2019年5月在昆明医科大学附属口腔医院牙周病科就诊的11例GAgP患者和14例SCP患者。其中GAgP患者年龄21~32岁,平均(26.16 ± 4.40)岁,男性4例,女性7例;SCP患者年龄36~64岁,平均(44.36 ± 8.51)岁,男性8例,女性6例。诊断标准严格按照1999年牙周病分类国际研讨会所制定的标准。所有患者试验前均签署知情同意书。纳入标准如下:①GAgP患者年龄不超过35岁,全口至少有6颗取样患牙,探诊深度(probing depth, PD) ≥ 6 mm,临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL) ≥ 5 mm, X线片显示有邻面牙槽骨吸收,无明显的咬合关系异常,未接受正畸治疗;②SCP患者年龄35岁以上,全口至少有6颗取样患牙,PD ≥ 6 mm, CAL ≥ 5 mm, 牙槽骨

吸收超过根长的1/2;③半年内未进行过任何牙周治疗;④3个月内未使用过抗生素或非甾体类抗炎药;⑤至少有20颗天然牙,且每个象限都余留有天然牙;⑥同意参加此项研究。排除标准如下:①妊娠及哺乳期妇女;②患有糖尿病、心血管疾病和血液性疾病等系统性疾病者;③吸烟者。

1.2 牙周检查及治疗

记录纳入病例PD、CAL和探诊出血等指标,进行牙周基础治疗,包括龈上洁治、龈下刮治、根面平整和口腔卫生指导。牙周基础治疗的方法:使用瑞士EMS牙周治疗仪进行龈上洁治,龈下刮治、根面平整及抛光,同时进行口腔卫生指导,1周后复诊再次清理残余牙石。龈上洁治效果是肉眼看不到牙石和色素,龈下刮治及根面平整效果是探诊根面光滑平整,无残余牙石。

1.3 样本采集及基因组DNA提取

在基线及牙周基础治疗后第6周分别采集龈下菌斑,两次采集位点相同,共采集50个样本。GAgP基线时样本记为QA组,牙周治疗后第6周样本记为QB组;SCP基线时样本记为MA组,基础治疗后第6周样本记为MB组。将患者口腔分为6个区段,采集每个区段内PD最深位点的龈下菌斑。去除龈上菌斑,Gracey刮治器采集龈下菌斑,并将6个位点的集合菌斑迅速置入1个装有750 μ l灭菌TE缓冲液的1.5 ml EP管,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。使用微量样品基因组DNA提取试剂盒(天根公司,中国)提取龈下菌斑样本中的基因组DNA,并用微量紫外分光光度计测定DNA纯度和浓度。

1.4 样本前处理及高通量测序

使用引物515f和806r扩增16s rDNA的V4高变区。第一轮PCR反应体系:2 \times High-Fidelity Master Mix 12.5 μ L、PE1-515f(10 μ M)0.25 μ L、PE2-806r(10 μ M)0.25 μ L、Template DNA 3 μ L、ddH₂O 25 μ L;循环条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;15个循环(94 $^{\circ}$ C,45 s;50 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s);72 $^{\circ}$ C延伸5 min。第二轮PCR反应体系:PE1.0-L(100 μ M)0.15 μ L、index primer(10 μ M)1.5 μ L;循环条件:98 $^{\circ}$ C预变性1 min;15个循环(98 $^{\circ}$ C,10 s;56 $^{\circ}$ C,20 s;72 $^{\circ}$ C,20 s);72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物进行1%琼脂糖电泳,150 V、100 mA电泳观察20 min,切割目的条带并纯化,BioTek酶标仪定量,Illumina MiSeq平台进行高通量测序。

1.5 生物信息学分析

利用QIIME(quantitative insights in microbial

ecology)、Mothur以及SPSS(26.0版本)等软件对原始数据去杂得到优化序列,根据97%相似度对优化序列进行可操作分类单元(operational taxonomic unit,OTU)聚类,选择每个OTU中丰度最高的序列作为OTU的代表序列,将OTU代表序列与物种分类数据库作比对,注释样品中的物种信息,绘制相对丰度柱状图和热图;计算菌群丰度指数以及菌群多样性指数(Shannon、Simpson指数),绘制稀释曲线,通过 t 检验、non-parametric factorial Kruskal-Wallis sum-rank 检验及皮尔逊系数函数对群落进行 α 多样性分析与 β 多样性分析,绘制主坐标分析(principal coordinates analysis,PCoA)图;进行LEfSe差异分析(linear discriminant analysis effect size)、Network网络分析以及使用KEGG PATHWAY数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)对群落功能进行预测。检验水平为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 龈下菌斑菌群相对丰度

本次测序50个样本共获得19 580 817条原始序列,经过滤最终获得19 302 060条高质量序列,按97%相似度进行聚类得到2 364个OTU,与数据库比对注释到19门,38纲,64目,112科,209属,125种。门、属和种三个水平的优势菌在各组中的相对丰度见图1。属水平的相对丰度热图见图2,其中卟啉单胞菌属和密螺旋体属等主要分布于GAgP和SCP基线样本中,放线菌属和罗氏菌属等主要分布在GAgP和SCP治疗后第6周的样本中。

2.2 α 多样性分析

基线时GAgP和SCP的Shannon指数和Simpson指数无统计学差异($P > 0.05$,表1);治疗后第6周,两者的Shannon指数和Simpson指数均降低,其中SCP的Shannon指数降低有统计学意义($P < 0.05$,表2)。随着测序深度增加,当序列数超过50 000时,说明此次测序量已经足够覆盖所有菌种(图3)。

2.3 β 多样性分析

如图4所示,QA组和MA组距离近,说明基线时GAgP和SCP龈下菌群相似;QB组和MB组距离接近,但与QA组和MA组分开,说明治疗后第6周GAgP和SCP龈下菌群相似,但与基线不同。与QA组和MA组内各样本间距离相比,QB组和MB组内各样本间距离稍分散,说明治疗后第6周龈下菌群变化因个体差异稍有不同。

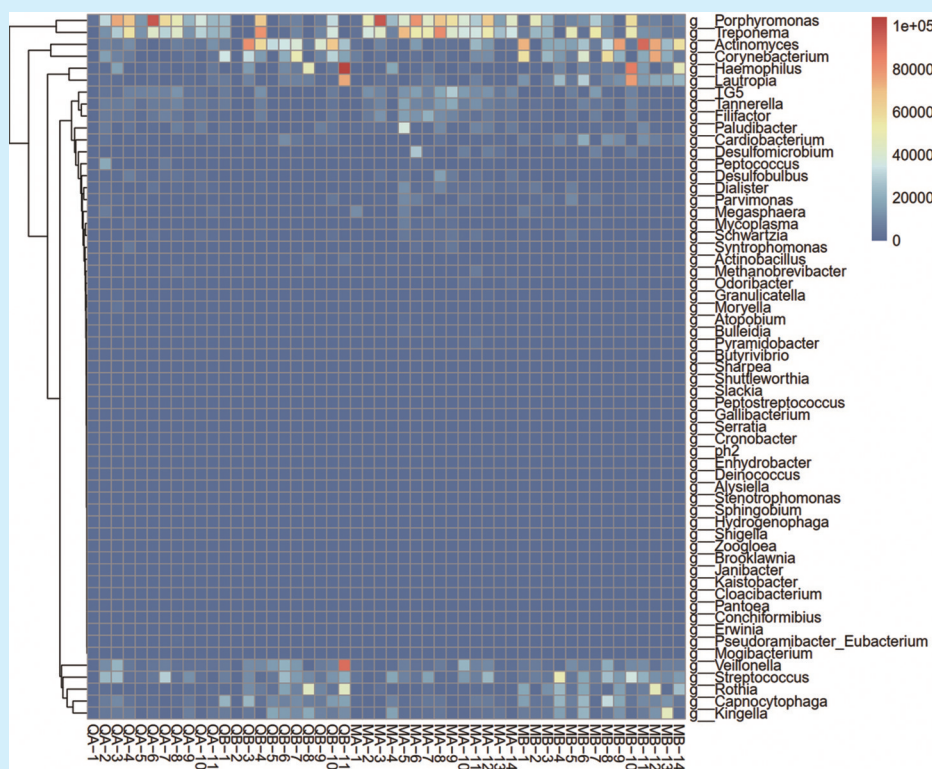
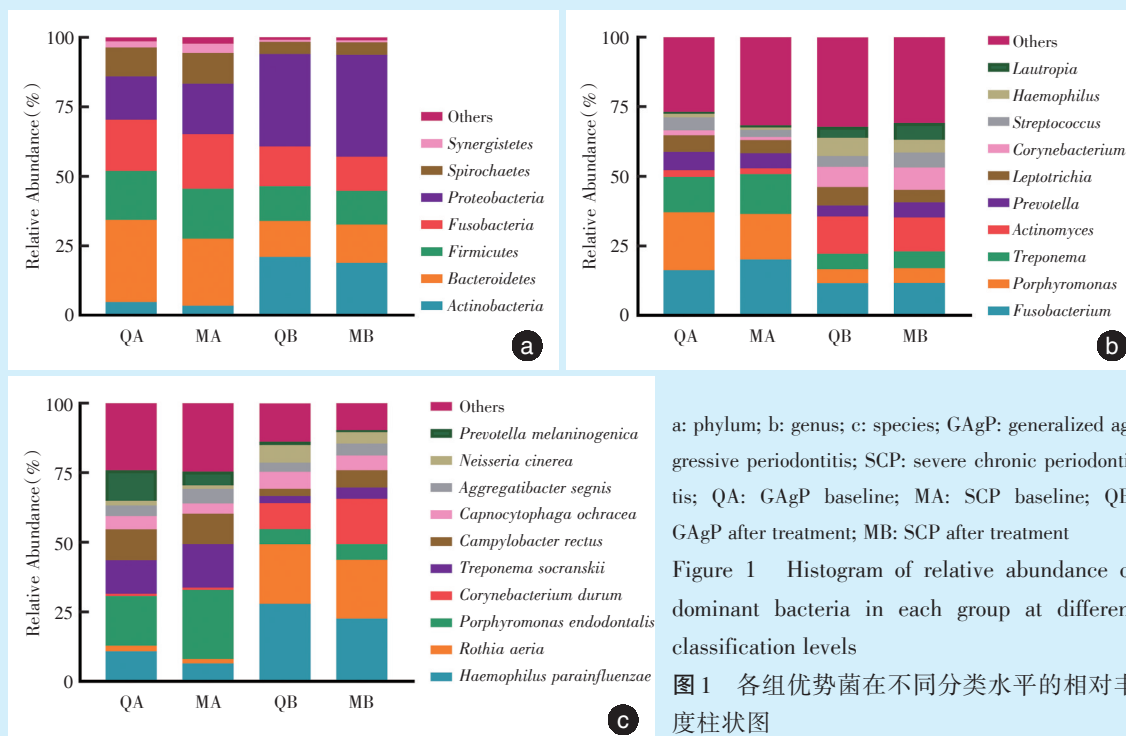


表1 GAgP和SCP基线时 α 多样性指数Table 1 The α diversity index of GAgP and SCP at baseline

	GAgP	SCP	<i>t</i>	<i>P</i>
Shannon index	5.69 ± 0.46	5.67 ± 0.46	0.080	0.937
Simpson index	0.94 ± 0.02	0.94 ± 0.25	0.280	0.782

GAgP: generalized aggressive periodontitis; SCP: severe chronic periodontitis

表2 GAgP和SCP基础治疗前后 α 多样性指数Table 2 The α diversity index of GAgP and SCP before and after initial therapy

α diversity index	Shannon index		Simpson index	
	GAgP	SCP	GAgP	SCP
Baseline	5.69 ± 0.46	5.67 ± 0.46	0.94 ± 0.02	0.94 ± 0.25
6 th week after initial therapy	5.07 ± 0.76	5.32 ± 0.44	0.91 ± 0.05	0.93 ± 0.22
<i>t</i>	2.146	2.356	1.883	1.088
<i>P</i>	0.057	0.035	0.089	0.296

GAgP: generalized aggressive periodontitis; SCP: severe chronic periodontitis

2.4 LEfSe 差异分析

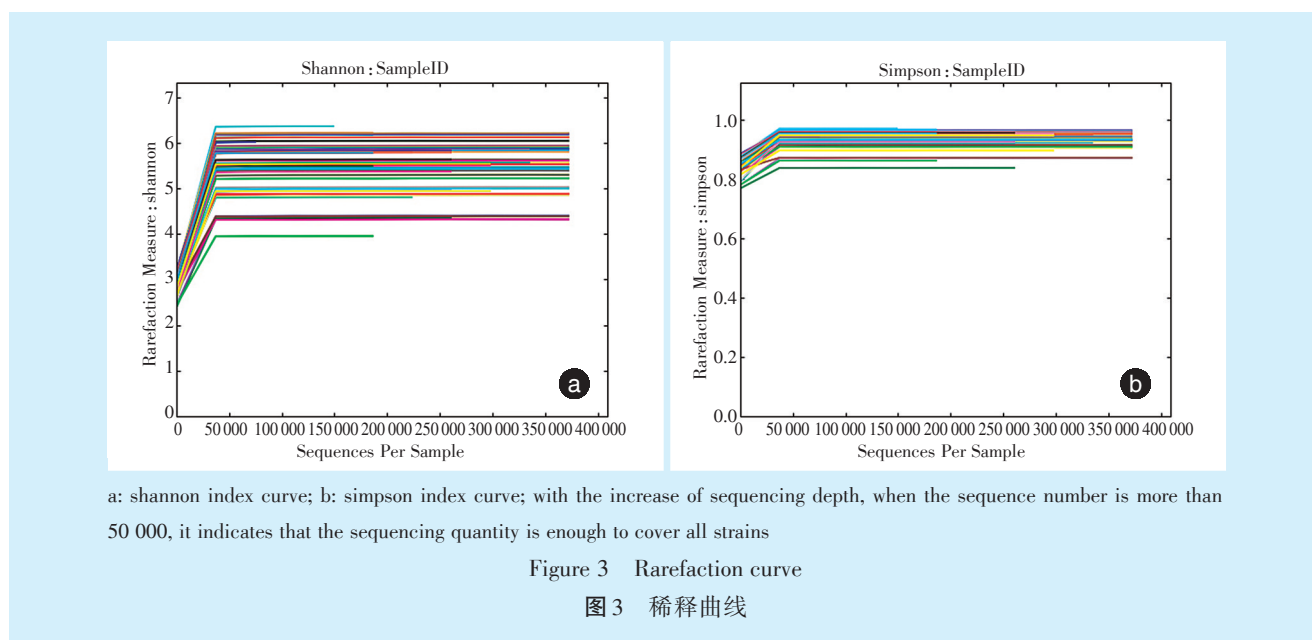
LEfSe 分析用于寻找各组间具有统计学差异的生物标志物,如图5,在门、纲和目水平,放线菌在GAgP 治疗后第6周增加,且线性判别分析分值(LDA score)大于5,说明放线菌是GAgP 治疗后显著增加的细菌。

2.5 Network 网络分析

网络图可以研究细菌与细菌之间的关系,网络中两个图标距离越近,说明它们越相关。如图6,本实验共发现10个紧密联系的细菌关系网络,小杆菌属、产线菌属及密螺旋体属等33个菌属构成最大的关系网络,二氧化碳噬纤维菌属、链球菌属及金氏菌属等19个菌属构成第二大关系网络,这两大关系网络均有链球菌属参与。

2.6 群落功能预测

本次测序通过KEGG PATHWAY 数据库(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)对群落功能



进行预测,未发现GAgP和SCP龈下菌群间存在显著差异的群落功能,差异主要体现在GAgP和SCP治疗前后,GAgP预测到62种功能在治疗后第6周发生改变($P < 0.05$),SCP预测到38种群落功能在治疗后第6周发生改变($P < 0.05$);其中与氨基酸代谢、甲烷代谢和肽酶等相关的功能降低(群落功能预测图见本文OSID码)。

3 讨论

3.1 龈下菌群的组成和结构分析

基线时,GAgP和SCP的优势菌在门、属和种水

平均无明显差异。优势菌门和优势菌属与Han等^[5]和Tsai等^[6]的研究一致,包括拟杆菌门、梭杆菌门和卟啉单胞菌属等。优势菌种包括牙髓卟啉单胞菌、直肠弯曲菌和索氏密螺旋体等,未检出牙龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体等常见的代表菌种,此结果与Szafranski等^[7]的研究结果不完全相同,分析这一现象与测序选择扩增的16s rDNA高变区不同有关。Szafranski等^[7]扩增的是V1-V2和V5-V6高变区,结果可检测到牙龈卟啉单胞菌和齿垢密螺旋体等常见的牙周致病菌,本实验扩增的是V4高变区,故检出的是大量的牙髓卟啉单胞

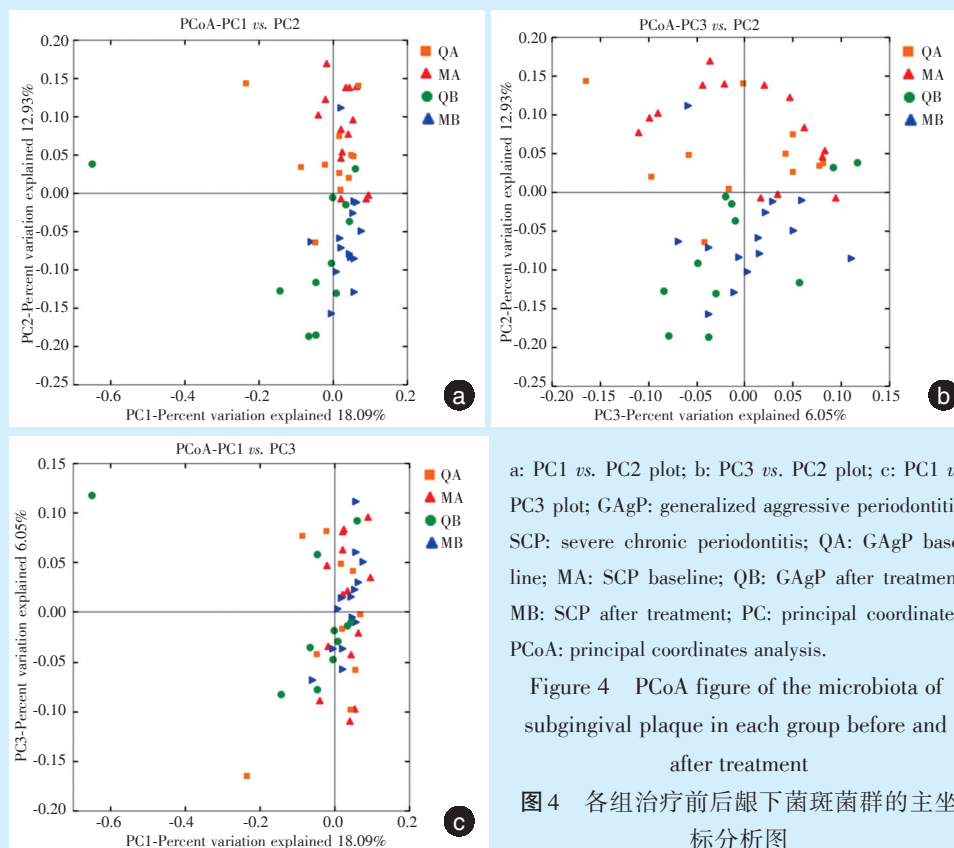


Figure 4 PCoA figure of the microbiota of subgingival plaque in each group before and after treatment

图4 各组治疗前后龈下菌斑菌群的主坐标分析图

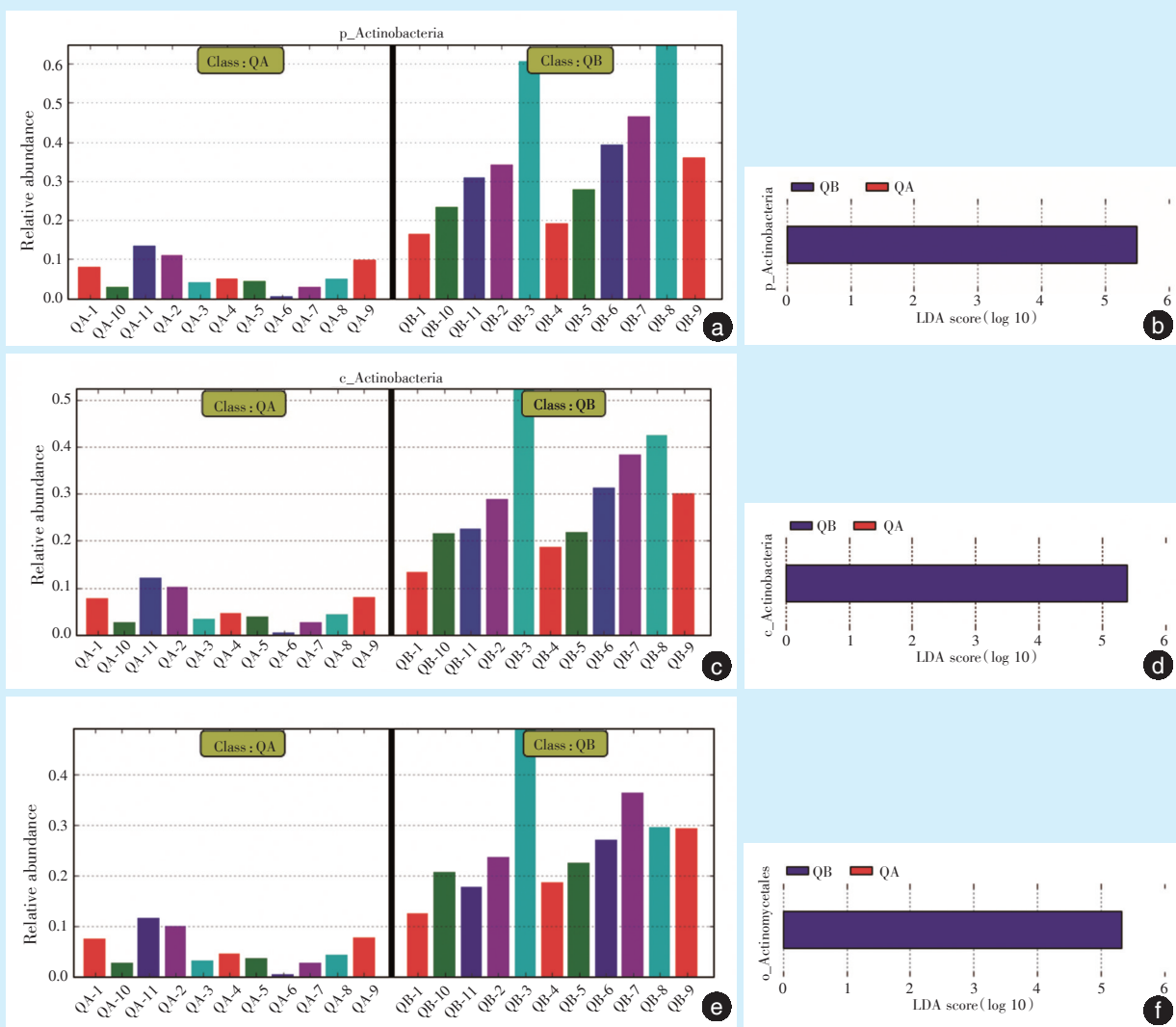
菌。该结果说明龈下菌群组成结构复杂多样,除了常见的牙周致病菌外,还有许多其他细菌发挥着重要作用,而HTS有助于发现更多的菌群。16s rDNA高变区的选择还与测序平台有关,本实验使用的Illumina MiSeq平台测序成本相对较低,测序深度也较深^[8],V3~V4区是该平台经常选择的区域,故产生上述差异。治疗后第6周,GAgP和SCP龈下菌群变化趋势相似,拟杆菌门和卟啉单胞菌属等相对丰度降低,放线菌门和链球菌属等相对丰度增加,与之前的研究结果相同。

LEfSe分析强调统计学意义和生物相关性,能够在组与组之间寻找具有统计学差异的生物标志物^[9]。Szafranski等^[7]通过LEfSe分析发现牙周炎患者与牙周健康者的生物标志物不同。本实验未发现GAgP和SCP间存在差异性生物标志物,而在GAgP患者治疗后第6周的龈下菌群中发现,放线菌在门、纲、目水平显著增加。放线菌是牙周健康者富集的细菌^[6],本次结果提示可将其作为判断GAgP患者预后的潜在微生物标志物。AgP常与伴放线聚集杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aa*)存在高度相关。本实验未发现*Aa*,与

Schulz等^[2]的结果一致,分析原因如下:①不同的地区人种会影响*Aa*的检出率,非洲及中东等地区的AgP患者中*Aa*检出率较亚洲等地高^[10],*Aa*中毒性较高的JP2基因型也多分布在非洲等地^[11],本实验的研究对象均为亚洲人,故未检测到*Aa*;②*Aa*的定植常发生在青少年时期,且多导致典型的局限型侵袭性牙周炎^[10],本实验的研究对象是平均年龄(26.18 ± 4.40)岁的GAgP患者,多处于晚期重度,也可能影响*Aa*的检出。

3.2 群落多样性分析

本实验中,GAgP与SCP基线时 α 多样性指数无统计学差异,基础治疗后第6周,Shannon指数和Simpson指数降低,说明基础治疗可以降低龈下菌群的多样性,Campisciano等^[12]的研究也说明非手术治疗后龈下菌群的 α 多样性降低。本实验 β 多样性分析显示基线时GAgP和SCP龈下菌群的组成结构相似,但治疗后第6周菌群变化存在个体差异,与Schwarzberg等^[13]的结果相似。基础治疗后牙周袋变浅,此时的龈下菌群更易受口腔卫生和饮食等个体因素的影响;Chen等^[14]通过评估口腔微生物群落迁移的生态过程发现,个体内微生物



In LEfSe, non parametric factorial Kruskal Wallis sum rank test was used to count the groups with significant difference in abundance, and then LDA was used to estimate the impact of species richness on the difference effect, but the effect of QA species richness on the difference effect cannot be calculated; a-b: phylum; c-d: class; e-f: order; GagP: generalized aggressive periodontitis; SCP: severe chronic periodontitis; LEfSe: linear discriminant analysis effect size; LDA: linear discriminant analysis; QA: GagP baseline; QB: GagP after treatment

Figure 5 LEfSe analysis of the changes of subgingival microbiota in GagP group before and after treatment

图5 GagP组治疗前后菌群变化的LEfSe差异分析

群落的均质化扩散作用比个体间明显,这一作用导致个体内不同位点的菌群更加相似,而个体间的菌群存在差异。群落多样性分析提示龈下菌斑控制的重要性,龈下菌斑生物膜是有序排列的建筑式样结构,多样性高在一定程度上意味着龈下菌群间联系紧密,丰富度越高,微生态系统更稳定。因此充分去除生物膜有利于牙周健康,尤其对于牙周炎患者来说,预防龈上菌斑的堆积可以延缓龈下菌斑生物膜的重新定植^[15],这也是牙周维护治疗的重要意义。

3.3 龈下菌群相关性分析

本实验通过Network网络分析发现10个相互联系的细菌网络,其中最大的关系网络包括小杆菌属、产线菌属及密螺旋体属等33种菌属,它们大多是与牙周炎相关的菌属,与Chen等^[14]的研究结果相同;第二大关系网络包括二氧化碳噬纤维菌属、链球菌属及金氏菌属等19种菌属,它们大多是与牙周健康相关的菌属。在上述两大关系网络中,链球菌属均有参与,提示链球菌属在龈下菌群由健康向失调转变的过程中可能发挥着重要作用。

SCP患者龈下菌群的组成、多样性、菌群关系及群落功能等信息,并观察了牙周基础治疗前后的菌群变化,结果显示GAgP和SCP的龈下菌群相似,牙周基础治疗可以改变龈下菌群组成和结构,降低群落多样性,降低氨基酸代谢、甲烷代谢和肽酶等群落功能。链球菌属在龈下菌群由健康向失调转变的过程中可能发挥着重要作用。不足之处:本实验只观察了牙周基础治疗后第6周龈下菌群的变化,未进行远期效果的观察,今后应延长追踪时间,观察远期效果;在进行高通量测序时,本实验只选择了16s rDNA的一个高变区进行扩增,在细菌种水平上的鉴定不够完善,在今后的实验中应在测序平台读长允许的条件下选择多个高变区组合进行测序。

[Author contributions] Yang WJ performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. Xu J designed the study. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- Pérez-Chaparro PJ, McCulloch JA, Mamizuka EM, et al. Do different probing depths exhibit striking differences in microbial profiles? [J]. *J Clin Periodontol*, 2018, 45(1):26 - 37. doi: 10.1111/jcpe.12811.
- Schulz S, Porsch M, Grosse I, et al. Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 99:169-176. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.015.
- Chen H, Peng S, Dai L, et al. Oral microbial community assembly under the influence of periodontitis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182259. doi: 10.1371/journal.pone.0182259.
- 唐灿, 刘诗雨, 程磊. 口腔微生物群落结构的影响因素 [J]. *口腔疾病防治*, 2020, 28(6): 390 - 393. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2020.06.009.
Tang C, Liu SY, Cheng L. Factors influencing the structure of the oral microbiome [J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2020, 28(6): 390-393. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2020.06.009.
- Han J, Wang P, Ge S. The microbial community shifts of subgingival plaque in patients with generalized aggressive periodontitis following non-surgical periodontal therapy: a pilot study [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6): 10609-10619. doi: 10.18632/oncotarget.12532.
- Tsai CY, Tang CY, Tan TS, et al. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2018, 51(2): 226-234. doi: 10.1016/j.jmii.2016.04.007.
- Szafranski SP, Wos-Oxley ML, Vilchez-Vargas R, et al. High-resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(3): 1047-1058. doi: 10.1128/AEM.03534-14.
- Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: a Next generation sequencing platform for genomic analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1706: 223-232. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12.
- Dhariwal A, Chong J, Habib S, et al. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1):W180-W188. doi: 10.1093/nar/gkx295.
- Fine DH, Armitage GC, Genco RJ, et al. Unique etiologic, demographic, and pathologic characteristics of localized aggressive periodontitis support classification as a distinct subcategory of periodontitis [J]. *J Am Dent Assoc*, 2019, 150(11): 922 - 931. doi:10.1016/j.adaj.2019.07.024.
- Ennibi OK, Claesson R, Akkaoui S, et al. High salivary levels of JP2 genotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is associated with clinical attachment loss in Moroccan adolescents [J]. *Clin Exp Dent Res*, 2019, 5(1): 44-51. doi: 10.1002/cre2.156.
- Campisciano G, Toschetti A, Comar M, et al. Shifts of subgingival bacterial population after nonsurgical and pharmacological therapy of localized aggressive periodontitis, followed for 1 year by Ion Torrent PGM platform [J]. *Eur J Dent*, 2017, 11(1): 126-129. doi: 10.4103/ejd.ejd_309_16.
- Schwarzberg K, Le R, Bharti B, et al. The personal human oral microbiome obscures the effects of treatment on periodontal disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86708. doi: 10.1371/journal.pone.0086708.
- Chen C, Hemme C, Beleno J, et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy [J]. *ISME J*, 2018, 12(5): 1210-1224. doi: 10.1038/s41396-017-0037-1.
- Hartenbach F, Silva-Boghossian CM, Colombo A. The effect of supragingival biofilm re-development on the subgingival microbiota in chronic periodontitis [J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 85: 51-57. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.10.007.
- Sitkiewicz I. How to become a killer, or is it all accidental? Virulence strategies in oral streptococci [J]. *Mol Oral Microbiol*, 2018, 33(1): 1-12. doi: 10.1111/omi.12192.
- Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, et al. Biology of oral *Streptococci* [J]. *Microbiol Spectr*, 2018, 6(5): 10. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018.
- Mallick H, Franzosa EA, Melver LJ, et al. Predictive metabolomic profiling of microbial communities using amplicon or metagenomic sequences [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3136. doi: 10.1038/s41467-019-10927-1.
- Kirst ME, Li EC, Alfant B, et al. Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(2): 783-793. doi: 10.1128/AEM.02712-14.

(编辑 周春华, 曾曙光)



官网



公众号