DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.023
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1302 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1302-02

# 恶性血液病患者肠道双歧杆菌的定量调查

姜明杰[1],黎永学[2],任 辉[3],练 燕[1],靳 彦[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]肿瘤血液科;[2]综合实验研究中心;[3]护理部;重庆 400038)

提 要:目的 研究恶性血液病患者化疗前后肠道双歧杆菌(Bifidobacterium)数及检出率的变化情况。方法 用自制改良BS培养基对52例恶性血液病患者化疗前后大便进行双歧杆菌定量检测。结果 恶性血液病患者肠道双歧杆菌数较正常人明显减少,化疗前肠道双歧杆菌检出率为44.2%,化疗后肠道双歧杆菌检出率为15.4%,较化疗前检出率显著降低($P<0.01$)。结论 恶性血液病患者化疗前后肠道双歧杆菌数有明显的变化,调节恶性血液病患者肠道微生态平衡,有助于促进恶性血液病患者健康状况的改善。

关键词:恶性血液病;双歧杆菌;改良BS培养基
中图法分类号:R379.1;R733.7 文献标识码:A

# Quantitative investigation of intestinal bifidobacterium of patients with malignant hematological disease

JIANG Ming-jie, LI Yong-xue, REN Hui, LIAN Yan, JIN Yan (Department of Oncology and Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To study the changes of intestinal bifidobacterium count before and after chemotherapy in patients with malignant hematological diseases. **Methods** Intestinal bifidobacterium count before and after chemotherapy in 52 cases of malignant hematological diseases was investigated by improved BS medium. **Results** Intestinal bifidobacterium count of patients with malignant hematological diseases was lower than that of normal persons. The detected rates of bifidobacterium in patients with malignant hematological disease were 44.2% (in $10^{-6}$ dilution degree) before chemotherapy and 15.4% (in $10^{-6}$ dilution degree) after chemotherapy. Intestinal bifidobacterium count of patients with malignant hematological diseases after chemotherapy was lower than before chemotherapy ($P<0.01$). **Conclusion** There are some changes of intestinal bifidobacterium count in patients with malignant hematological diseases before and after chemotherapy. The regulation of the intestinal microecological balance of patients with malignant hematological diseases after chemotherapy is beneficial to the amelioration of health of patients.

**Key words**: malignant hematologic disease; bifidobacterium; improved BS medium

双歧杆菌(Bifidobacterium)是人和动物肠道内最主要的生理性细菌之一,在微生态学上属于原籍菌群,它与其它生理性细菌成员构成一个微生物群落,并与宿主构成一个微生态系统。双歧杆菌在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体健康状况。本研究对恶性血液病病人肠道双歧杆菌进行定量调查,了解恶性血液病病人肠道微生态状况,以便临床在治疗恶性血液病的同时注重肠道微生态的调节和保护,有利于恶性血液病病人健康状况的改善。现介绍如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象和菌种来源

1.1.1 研究对象 收集本科2001-03-21—2001-06-09期间住院、确诊的52例(男性31例、女性21例,年龄18~75岁)恶性血液病患者化疗前后新鲜大便标本各一份,进行双歧杆菌大便稀释培养计数。

1.1.2 菌种来源 菌种来源于重庆医科大学临床微生物教研室保存的双歧杆菌标准菌株两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum* 1101)。

### 1.2 检测方法

1.2.1 标本的采集 取自然排出的新鲜粪便10 g左右,置入厌氧罐内,立即送检分离,所需时间严格控制在30 min之内。

1.2.2 双歧杆菌的检测

1.2.2.1 自制改良BS培养基 胰胨6 g,多胨8 g,植胨3 g,酵母膏5 g,葡萄糖10 g,可溶性淀粉0.5 g,L-半胱氨酸0.5 g,吐温—80 1 ml,维生素$K_1$ 0.1 ml,氯化血红素5 mg,吡福多素(异麦芽寡糖,)0.1 ml,溶液A(磷酸二氢钾25 g,磷酸氢二钾25 g,蒸馏水250 ml)5 ml,溶液B(硫酸镁10 g,氯化钠0.5 g,硫酸亚铁0.5 g,硫酸锰0.337 g,蒸馏水250 ml)5 ml,牛肉汤1 000 ml,加热溶解,调pH 7.2,加琼脂20 g,X-Gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)60 mg,115℃,15 min,冷至50℃左右,加脱纤维兔血50 ml,加添加剂(丙酸钠30 g,氯化锂6 g,加无菌蒸馏水100 ml溶化,然后加四环素0.1 g,卡那霉素5 mg,混匀,过滤除菌,4℃保存)50 ml,倾倒平板备用。

1.2.2.2 大便稀释液 磷酸二氢钠4.5 g,磷酸氢二钠6.0 g,L-半胱氨酸0.5 g,琼脂0.5 g,吐温—80 0.5 ml,蒸馏水1 000 ml,加热溶解,调pH 7.4~7.6,8 P,15 min,灭菌备用。

1.2.2.3 标本稀释和接种 取新鲜大便0.5 g于无菌试管内,加4.5 ml大便稀释液,充分混匀,在此基础上作$10^{-2}$~$10^{-9}$

作者简介:姜明杰(1963—),女,四川省广安市人,主管护师,主要从事恶性血液病病人肠道微生态的研究及护理方面的研究。电话:(023)68754000-73058

收稿日期:2002-05-21;修回日期:2002-10-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的稀释, 选择 $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$, $10^{-9}$ 4 种稀释度, 用 12 号针头滴管取四种不同稀释度, 各滴 3 滴于预先放置 37℃、3 h 的培养基平板上。同时用标准菌株接种于另一相同批次培养基平板, 对培养基进行质量控制。

1.2.2.4　厌氧培养　　将接种好标本和标准菌株的平板放置于厌氧培养罐中, 用氮气洗 2 次, 然后充满混合气体。放置于 37℃孵箱, 厌氧培养 48～72 h。

1.2.2.5　菌落计数　　将厌氧培养 48～72 h 的平板再置于有氧环境继续培养 6～8 h, 双歧杆菌呈蓝色、边缘整齐、突起的小菌落。选择其菌落具有可数性的稀释度, 计数其蓝色菌落, 并计算其 3 滴标本的菌落平均数。

1.2.2.6　革兰染色　　取深蓝色菌落涂片进行革兰染色。深蓝色菌落涂片革兰染色镜下均能见到双歧杆菌的典型 X、Y、V 形态。

1.2.2.7　双歧杆菌活菌数表示方法　　双歧杆菌活菌数取常用对数表示。其计算方法如下:

双歧杆菌活菌数(每克大便)= log[ 平均菌落数(滴)× 滴数(ml)× 稀释倍数]

1.3　统计学方法

采用 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

恶性血液病病人肠道双歧杆菌化疗前后检出情况: 以 $10^{-6}$ 稀释度作为标准, $10^{-6}$稀释度未见双歧杆菌生长视为未检出双歧杆菌, 双歧杆菌活菌数(每克大便)< 6.0; $10^{-6}$～$10^{-9}$稀释度双歧杆菌生长视为检出双歧杆菌, 双歧杆菌活菌数(每克大便)> 6.0, 检出情况见表 1。

表 1　恶性血液病病人化疗前后肠道双歧杆菌检出情况

**Tab 1　Positive rate of intestinal bifidobacterium before and after chemotherapy in malignant hematopoietic disease's patients**

| Disease | n | Before chemotherapy | | | After chemotherapy | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | <6.0 | >6.0 | Positive rate(%) | <6.0 | >6.0 | Positive rate(%) |
| Acute non lymphocytic leukemia | 12 | 7 | 5 | 41.2 | 11 | 1 | 8.3 |
| Acute lymphocytic leukemia | 7 | 5 | 2 | 28.6 | 7 | 0 | 0 |
| Chronic granulocytic leukemia | 16 | 11 | 5 | 31.3 | 16 | 0 | 0 |
| Non-Bolgkin's lymphoma | 10 | 4 | 6 | 40.0 | 7 | 3 | 30.0 |
| Multiple myeloma | 7 | 2 | 5 | 71.4 | 4 | 3 | 42.9 |
| Total | 52 | 29 | 23 | 44.2 | 45 | 7 | 15.4 * |

*: $P<0.01$ *vs* before chemotherapy

## 3　讨论

双歧杆菌为专性厌氧菌, 标本采集后要避免暴露于空气中, 尽可能快地带回实验室, 不要冷冻, 不要使用富集培养基或转移培养基。尽快用稀释液作适当稀释后接种于合适的培养基中, 置于适宜的厌氧条件下培养。每次标本检测需用标准菌株接种相同批次的培养基, 并在同一厌氧罐中进行厌氧培养, 以检测培养基的质量和厌氧环境。以保证每次检测结果的可靠性。

双歧杆菌和乳酸菌均含有半乳糖苷酶, 我们在自制改良 BS 培养基[1]中加入 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷(X-Gal)作为底物, 半乳糖苷酶可分解底物, 释放出吲哚。由于双歧杆菌的半乳糖苷酶活性比其它乳酸菌高, 吲哚释放的数量不同, 使双歧杆菌和乳酸菌菌落呈现不同深浅的颜色, 培养基平板上双歧杆菌菌落呈深蓝色, 其它细菌一般为白色或淡蓝色[2]。长双歧杆菌半乳糖苷酶在 $Mn^{2+}$ 的条件下可被少量激活, 双歧杆菌培养基中应加入适量的硫酸锰。据报道 25 种双歧杆菌 90%以上对半乳糖呈阳性反应[3], 因此该培养基能对双歧杆菌进行较好的选择。

我们自制的改良 BS 培养基除具有双歧杆菌生长必需的营养物质、维生素、微量元素外, 还添加了双歧杆菌生长因子"吡福多素"(异麦芽寡糖), 双歧杆菌在此培养基上能较好生长, 其它细菌受到抑制; 双歧杆菌在此培养基上形成的菌落的形态、大小与 BL 培养基上形成的菌落的形态、大小无多大差别, 而颜色易与其它细菌区别。因此该培养基是大便双歧杆菌计数较好的选择性培养基。

双歧杆菌是人和动物肠道内最主要的生理性细菌之一, 在微生态学上属于原籍菌群, 它与其它生理性细菌成员构成一个微生物群落, 并与宿主构成一个微生态系统。双歧杆菌具有维持微生态平衡、生物拮抗、提高人体对乳糖耐受性、降低血脂、合成多种维生素等多方面的生理功能。双歧杆菌的存在, 有利于宿主的消化、吸收、营养, 并且在抗感染、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、改善免疫功能等方面具有促进作用。因此双歧杆菌在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体健康状况。

本研究结果显示恶性血液病患者化疗前双歧杆菌检出率为 44.2 %, 明显低于文献[4]报道的正常人肠道双歧杆菌检出率 100%。化疗后肠道双歧杆菌检出率为 15.4%, 较化疗前检出率显著降低。表明恶性血液病患者肠道微生态平衡严重失调, 与恶性血液病接受化疗关系密切, 可能与抗生素的大量使用有关。本研究表明恶性血液病患者化疗前后肠道微生态平衡严重失调是引起其消化功能变化的主要原因之一。

恶性血液病患者化疗前后肠道双歧杆菌数有明显的变化表明, 调节恶性血液病患者肠道微生态平衡, 有助于促进恶性血液病患者健康状况的改善, 本研究结果为其提供了理论依据。也为恶性血液病的护理工作提出新的要求, 寻求保护和改善恶性血液病病人肠道微生态平衡的方法是我们面临的又一课题。

(致谢: 本课题研究承蒙本院梁后杰主任、陈洁平副主任、张翼军教授及重庆医科大学临床微生物张德纯教授指导, 在此表示衷心的感谢!)

参考文献:

[1] 张德纯, 刘明言, 陈淑惠, 等. 重庆市正常人群肠道双歧杆菌的定量调查[J]. 中国微生态学杂志, 1989, 1(1): 63.
[2] 刘　兰, 曹郁生, 黄筱萍. 双歧杆菌选择性计数方法的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(4): 61－63.
[3] 康　白. 双歧杆菌[M]. 大连: 大连海事大学出版社, 1998. 68－69.
[4] 吴仲文, 李兰娟, 马伟杭, 等. 肠道菌群正常参考值的检测[J]. 中国微生态学杂志, 2001, 13(6): 314－315.

(编辑　张　宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net