

在腹泻时肠道菌群变动的初步分析

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

张旭帆 李忠元 张秀琴 胡淑敏 刘秉阳

人体肠道的正常菌群与某些致病菌之间的生态关系在国外已为人们所关注^[1]。腹泻病因复杂,在遭遇病原体的条件相似的人群中有人发病、有人不感染,这一现象主要与人体的健康状况、免疫能力以及肠道菌群不同有关。通过用无菌动物进行的大量试验说明,正常人和动物的肠道菌群具有营养、维生素合成、免疫和生物拮抗等重要作用^[2,3],在使用较多抗菌药物、激素、免疫抑制剂和接受放射治疗后将在人体中导致菌群失调或肠道菌群交替症,从而使人患肠道细菌性疾病(如大肠杆菌所致腹泻、痢疾等)。因此,深入调查了解儿童及成人肠道内常住菌种类、性质及其与致病菌之间的生态学关系有一定的意义。我们对正常儿童和腹泻儿童肠道内几种主要细菌进行了初步调查和分析,为进一步研究人和实验动物肠道菌群的变动及菌群失调后进行调正以恢复正常关系提供参考。

分离、培养方法

一、材料的选取:健康儿童(1~5岁)20例标本取于北京市百货大楼托儿所。腹泻患者(1~5岁)15例标本取于北京东单三条儿童医院门诊,凡是患儿腹泻每天超过5次以上、稀水便或粘液便,均可诊断为腹泻。取材前未服用抗菌药物。成人(20~30岁)15例标本取自本所驻军。

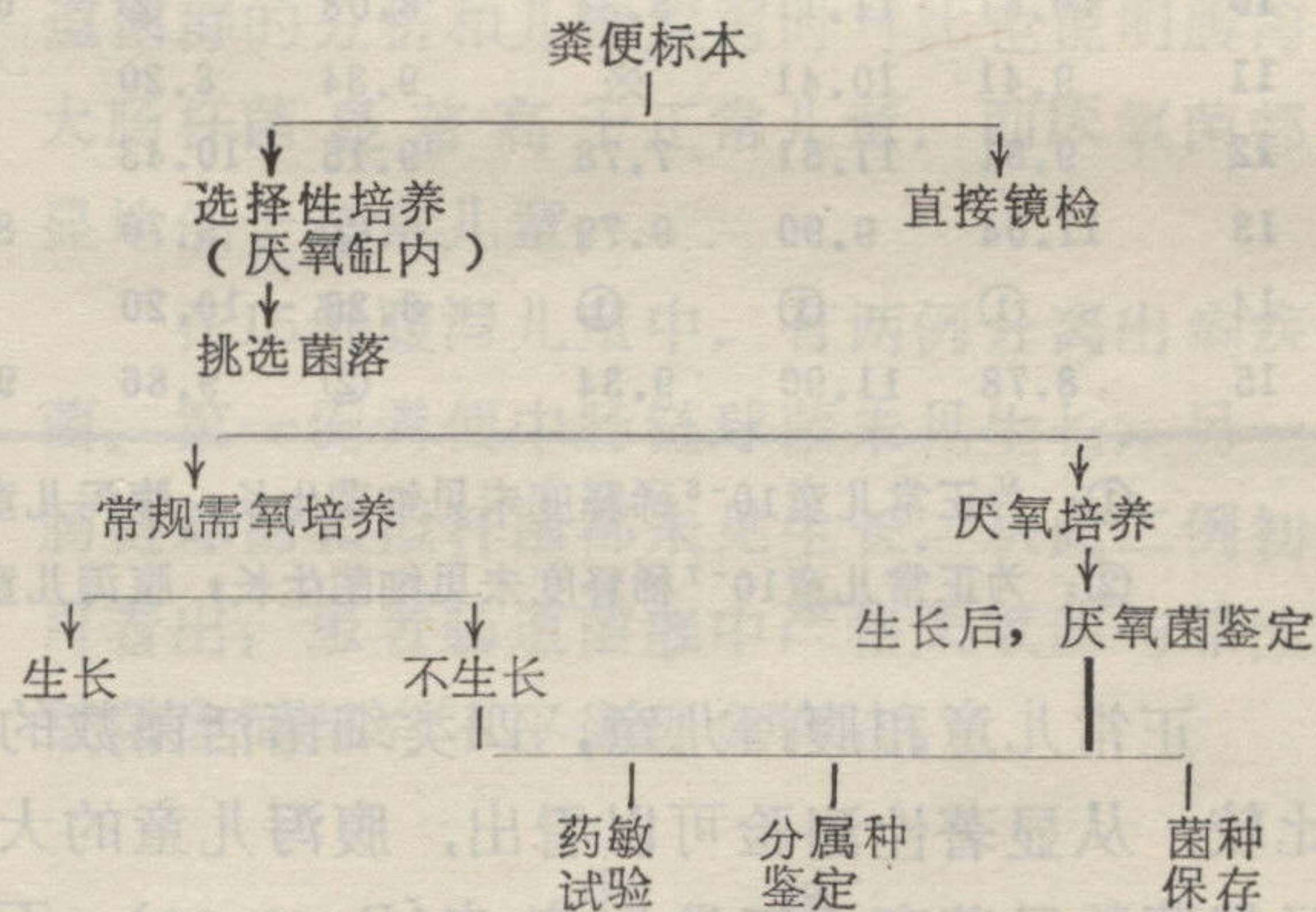
取新鲜的粪便标本0.5克,置于含有5毫升稀释液的及加有3~4粒玻璃珠的灭菌小瓶中,轻轻振荡,取其上清0.5毫升加入含4.5毫升稀释液的试管中,如此依次稀释至 10^{-10} 后取三种不同稀释度: 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 各0.1毫升分别滴加在不同选择性的培养皿表面,用

“L”棒涂开,生长后计算菌落数。

二、培养方法:选择性培养基是伊红美兰培养基、肠链球菌培养基、拟杆菌培养基、双歧杆菌培养基。稀释液和缺氧指示剂及酸性硫酸铜配制方法见参考文献^[4]。

兼性厌氧菌(大肠杆菌、肠链球菌等)按常规培养法进行。严格厌氧菌采用厌氧缸内培养法:用真空干燥的玻璃缸,缸内按容量1公升加入50克铁绒,铁绒在放入前用酸性硫酸铜溶液浸泡后立即放入缸内,将培养物放入缸内后,抽出缸内空气(8升容量大约抽10分钟),然后输入 CO_2 气至与大气平压为止。将缸放入 37°C 孵箱内培养4~5天(第一代),为了确定缸内氧气吸收情况一般加入美兰指示剂如缸内分子氧消失时,美兰溶液变成无色,如有氧存在时,指示剂保持美兰色。

三、厌氧菌的分离、鉴定步骤:



厌氧菌的生长速度在同一选择培养基中各菌属、菌种不一致,有的生长较快,在我们的实验条件下4~5天生长出多种可见的菌落,对厌氧菌和兼性厌氧菌的鉴定:1.涂片革兰氏染色检查形态特征,2.培养基上菌落形态,3.生化反应,4.血清学抗原分析。

结 果

一、15例正常儿童每克粪便中四类主要细菌的活菌数波动范围为：大肠杆菌8.78~11.04；肠链球菌8.08~9.60；拟杆菌10.08~11.99；双歧杆菌9.78~11.66。两类严格厌氧菌在15例中都有生长。正常儿童粪便中大肠杆菌和拟杆菌比较，拟杆菌非常显著地高于大肠杆菌 ($t=4.47$ $P<0.001$)(表1)。

二、15例腹泻儿童粪便中，细菌的活菌数波动范围为：大肠杆菌9.34~11.87之间；肠

链球菌7.90~10.43之间；拟杆菌9.08~10.78之间；双歧杆菌9.51~11.00之间。儿童腹泻时大肠杆菌和拟杆菌比较，与正常儿童的粪检结果刚好相反，大肠杆菌显著高于拟杆菌($t=3.04$, $P<0.01$)(表1)。

三、正常成人粪便中，细菌的活菌数波动范围是：大肠杆菌7.38~9.79之间；肠链球菌6.30~9.26；拟杆菌7.30~9.61；双歧杆菌8.08~10.00。从检出的四类细菌的比较可以看出，正常儿童大肠杆菌、拟杆菌、双歧杆菌都显著地高于正常成年人组(表1、图1)。

表1 正常儿童、腹泻儿童、正常成人各15例粪便的主要细菌组成

编 号	兼性厌氧菌 (个Log ₁₀ n/每克粪便)						严格厌氧菌 (个Log ₁₀ n/每克粪便)					
	大 肠 杆 菌			肠 球 菌			拟 杆 菌			双 歧 杆 菌		
	正常 儿童	腹泻 儿童	正常 成人	正常 儿童	腹泻 儿童	正常 成人	正常 儿童	腹泻 儿童	正常 成人	正常 儿童	腹泻 儿童	正常 成人
1	9.90	11.11	9.51	②	7.90	②	11.83	9.51	①	10.76	10.75	9.43
2	10.78	11.15	9.41	9.60	10.00	②	11.92	9.34	8.81	10.94	10.71	8.94
3	10.30	10.20	8.78	8.90	②	②	11.66	9.83	8.53	10.56	9.51	8.62
4	①	11.87	①	②	10.20	②	11.77	①	8.26	11.66	11.00	9.46
5	10.26	11.00	8.60	②	②	8.48	10.08	①	9.26	11.38	10.23	9.00
6	9.30	10.82	8.38	9.20	8.90	②	10.08	9.08	9.61	9.78	①	9.79
7	10.30	11.85	7.30	8.34	9.59	②	10.41	10.78	①	11.36	①	10.00
8	9.00	①	8.15	②	②	②	10.68	①	7.78	10.58	①	8.72
9	10.15	11.30	①	8.26	9.65	7.51	10.26	①	7.30	11.15	10.32	9.00
10	10.81	11.11	8.34	8.08	②	6.30	11.28	①	8.87	11.66	10.56	8.08
11	9.41	10.41	※	9.34	8.20	②	11.15	①	8.92	11.28	10.15	9.83
12	9.81	11.51	7.78	9.15	10.43	②	11.99	①	9.08	11.40	10.32	9.70
13	11.04	9.90	9.79	②	9.70	8.26	11.99	10.26	9.34	11.59	①	9.94
14	①	①	①	8.26	10.20	②	11.23	①	8.26	11.26	①	9.15
15	8.78	11.90	9.34	②	9.86	9.26	11.23	①	8.48	11.34	10.59	9.70

①：为正常儿童10⁻⁸稀释度未见细菌生长；腹泻儿童10⁻⁹稀释度未见细菌生长；成人10⁻⁷稀释度未见细菌生长。

②：为正常儿童10⁻⁷稀释度未见细菌生长；腹泻儿童10⁻⁸稀释度未见细菌生长；成人10⁻⁶稀释度未见细菌生长。

正常儿童和腹泻儿童，四类细菌活菌数的比较，从显著性测验可以看出，腹泻儿童的大肠杆菌数显著高于正常儿童者($P<0.02$)；而拟杆菌、双歧杆菌数腹泻儿童都非常显著地低于正常儿童(图1、2)。

在15例腹泻儿童患者中，从2例患者粪便中分离出三株痢疾杆菌；从一名患儿分离出Ⅰ相宋内氏志贺氏菌，另一名分离出福氏Ⅲ。志贺氏菌及Ⅰ相宋内氏志贺氏菌。

四、我们从正常儿童粪便中，初步分离和鉴定出的革兰氏阴性无芽胞厌氧杆菌中，拟杆菌属有6个种共30株(其中1株尚未定种)。革兰氏阳性无芽胞厌氧杆菌中双歧杆菌属4个种，兼性厌氧菌中乳酸杆菌属3个种，丙酸杆菌属1个种(表2)。

讨 论

肠道正常菌群是很复杂的，在肠道中菌群

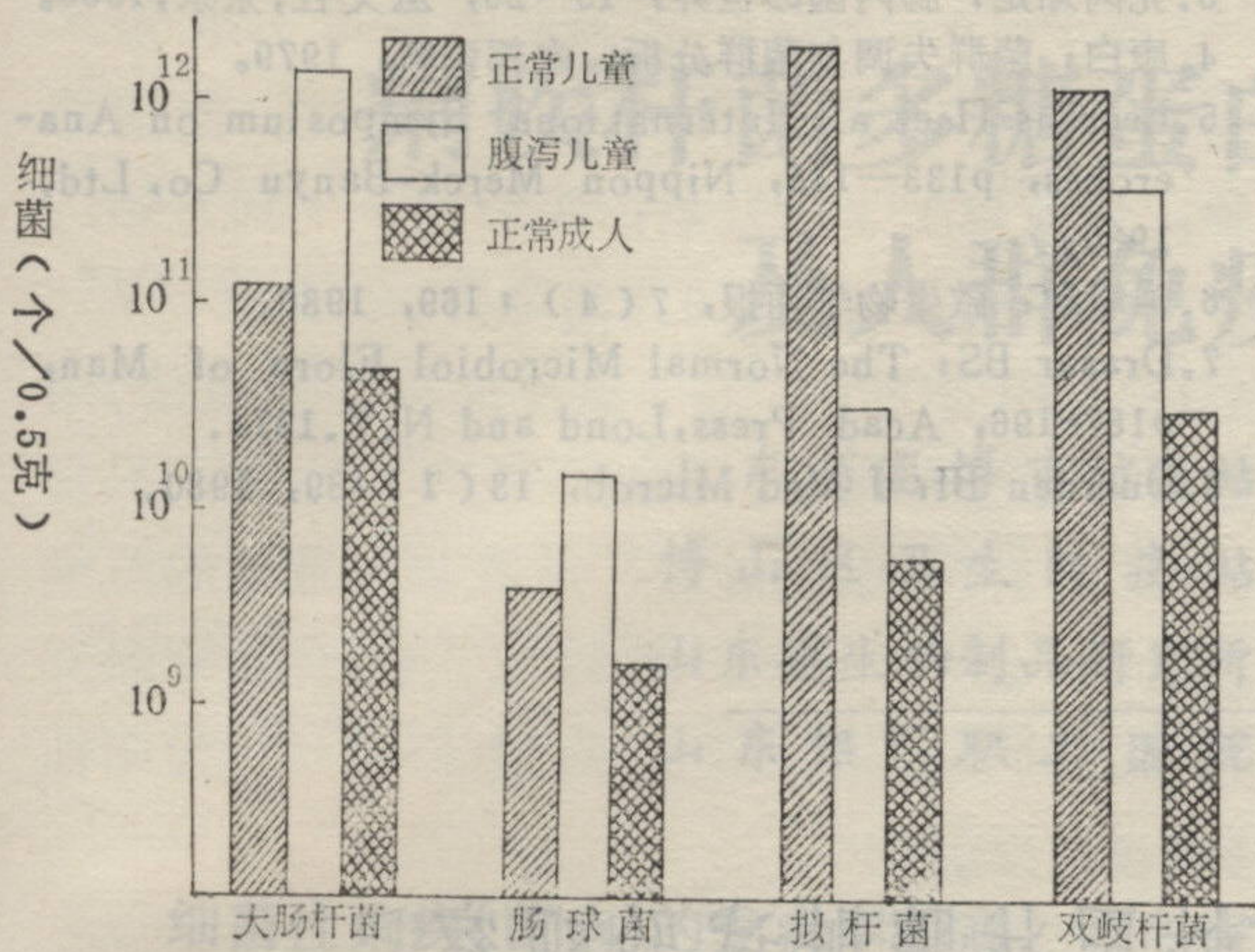


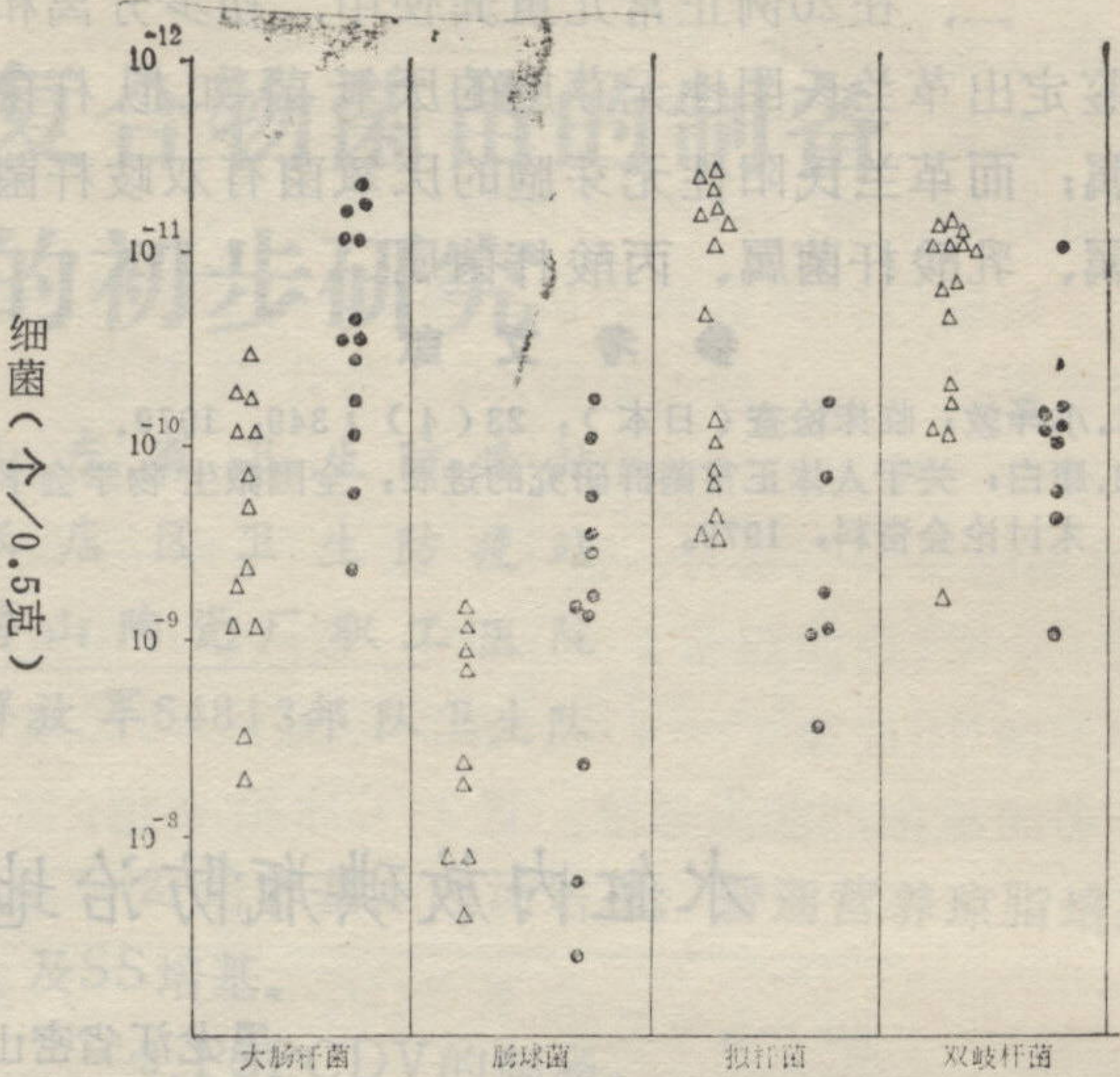
图1 15例正常和腹泻儿童及正常成人粪便中四种细菌菌量比较

表2 20例儿童粪便中厌氧菌种类

G ⁺ 、严格、兼性厌氧菌			G ⁻ 、严格厌氧菌		
属	种	菌株	属	种	菌株
Bif.	adolescentis	a 7	B.	fragilis	12
Bif.	Longum	a 5	B.	vulgatus	5
Bif.	eriksonii	1	B.	distassonis	5
Bil.	infantis	1	B.	ruminicola	5
L.	casei	5	B.	multiacidus	1
L.	jensenii	1	B.	thetaiomicron	1
L.	plantarum	1		未定	1
P.	acnes	1	合	计	30
	未定	3			
合	计	25			

之间有的共生、有的过路，既有互不相关、也有相互制约的关系，后者包括营养性竞争或受体占有后对后来者排斥等生态学现象^[5]。要想在人工的条件下将所有包括寄生性强的细菌都在体外培养出来是有困难的。现已肯定对肠道正常菌群的检查方法中，最好采用多种选择性培养基以期取得较多的结果^[6]。我们采用需氧和厌氧两种培养方法，对北京儿童肠道正常菌群中四类主要细菌进行了调查分析，所得数值和国外文献肠菌群数值的波动范围基本一致^[7]。

近年来由于厌氧菌培养技术的改进，发现在人体内正常菌群中厌氧菌占首位，其中绝大多数为无芽胞的厌氧菌。肠道每克大便中培养



(△为正常儿童，●为腹泻儿童)
图2 15例正常儿童和腹泻儿童粪便中主要细菌组成

出严格厌氧菌的数量比大肠杆菌约多一千倍^[8]。根据我们在正常儿童粪便中检出的大肠杆菌和拟杆菌的比较亦说明拟杆菌的数量明显地高于大肠杆菌($P < 0.001$)。

肠道菌群失调主要表现为肠道中常住菌的异常(增加、减少或消失)，患急性痢疾时除表现出痢疾杆菌优势繁殖外，主要是常住菌的消失，呈菌群交替状态。通过我们对正常儿童肠道菌群的分析 and 儿童腹泻时对比也说明腹泻时大肠杆菌显著高于正常儿童，而厌氧菌都明显地低于正常儿童。

在15例腹泻儿童中，有两例分离出痢疾杆菌。第一例粪便中肠链球菌未见生长，另一例肠链球菌和拟杆菌都未见生长，从此二例初步可看出：患者肠道菌群中严格厌氧菌与兼性厌氧菌之间都有不平衡现象存在。

小 结

一、正常儿童粪便中的四类细菌数值：大肠杆菌为8.78~11.04；肠链球菌7.30~9.60，拟杆菌10.08~11.99；双歧杆菌9.78~11.66。大肠杆菌和拟杆菌比较，拟杆菌显著地高于大肠杆菌。在儿童腹泻时，其大肠杆菌数值较正常时为高，而拟杆菌显著地低于正常儿童。

二、在20例正常儿童粪便中，初步分离和鉴定出革兰氏阴性无芽胞的厌氧菌如拟杆菌属；而革兰氏阳性无芽胞的厌氧菌有双歧杆菌属、乳酸杆菌属、丙酸杆菌属。

参 考 文 献

- 1.小泽敦：临床检查（日本），23（4）：349，1979。
- 2.康白：关于人体正常菌群研究的进展，全国微生物学会学术讨论会资料，1979。

- 3.光冈知足：肠内菌の世界，13~20，从文社，东京，1980。
- 4.康白：菌群失调与菌群分析，内部资料，1979。
- 5.Beerens H et al: International Symposium on Anaerobes, p133—145, Nippon Merck-Banyu Co, Ltd, 1980.
- 6.陈聪敏：微生物学通报，7（4）：169，1980。
- 7.Drasar BS: The Normal Microbiol Flora of Man, p187-196, Acad Press, Lond and N.Y.1974.
- 8.Duerden BI: J Med Microb, 13（1）：69，1980。

水缸内放碘瓶防治地方性甲状腺肿试验观察

黑龙江省密山县防疫站 献 林

将青霉素空瓶洗净烘干，将缝衣针烧红，将胶盖烫穿一小孔或扎一支5号针头（去掉尖，与胶盖平齐），孔径不超过1.0~1.5毫米。每瓶分装1克或2克纯碘，用塑料薄膜把瓶盖包扎严密。大缸投2克碘瓶、小缸投1克碘瓶，瓶系石块使沉底。24小时后测水碘浓度，保持在30~90微克/升为佳，连用三个月为一个疗程。按1978年秦皇岛会议规定体检与登记，在试验期中受试者不得用其它方式摄碘。连续放瓶三个月后检查防

治效果。

结果，放瓶前患病率为30.91%（132/427），放瓶后18个月患病率降至2.37%（9/380），有显著性差异（ $P < 0.01$ ）。同时观察132例地甲病患者，治愈121例，治愈率为91.67%，有效7例，为5.30%（治愈和有效均为1、2度患者），总有效率为96.97%（128/132）。放碘法无不良反应，易于推广应用。

皮上划痕布氏活菌苗误注肌肉引起发病的报告

哈尔滨医科大学附属第一医院 崔 蔚 矫吉祥 祝长秋

黑龙江省某毛纺厂1979年5月24日，从防疫站领得皮上划痕布氏104M活菌苗（长春生物制品所制造，批号7822-1，检定合格品），在盒签上印有“供皮上划痕用布氏菌苗，严禁注射”字样；但该厂卫生所竟粗心大意，将本菌苗注入肌肉内，共注射37人（其中1人调走，情况不详）。该苗包装每支安瓶含825亿菌体，为10人份，而误注时将5支菌苗注射36人（至第37人时另开一瓶）每人误注137.5亿菌体。

36人，多数于注射后3~24小时出现局部及全身反应。旋即按急性布病治疗。

局部及全身反应：36人，男21名，女15名。局部反应先出现，约2小时后即感痒、痛，次晨30人局部出现红肿热痛。6人浅淋巴结肿大，上肢抬举困难，

1~2周消肿。有6人局部化脓，切开引流。随着局部反应相伴而出现全身反应，36人中，发冷发热32人，腰痛24，关节痛20，头晕头痛18，食欲不振18，乏力12，恶心10，记忆力减退7，多汗5，睾丸痛2，睾丸炎1。所有症状头三天较重，持续1~2周。一般发热不超过20天缓解，轻者一周内缓解。多数人虽经抗菌素治疗，但某些症状持续时间较长，乏力，长期低热，有7人一年后仍有低热。大多数一年后治愈并恢复了工作。

其它临床检查或试验，如血相、肝功、胸透、心电图、布氏菌素变态反应、血清学检查（莱特反应、补结试验、半胱氨酸试验、虎红试验）等均与自然感染的布氏菌病人的结果相同或近似，不赘述。