

食管癌厌氧菌群的细菌学分析

何道生 王亚平 傅景华 李敬顺*

(中国人民解放军 304 医院, 北京)

摘要 对 20 例食管癌病人的食管粘膜和 22 例无食管疾患的胃镜检查患者的食管粘膜进行了需氧菌和厌氧菌检查。20 例食管癌病人共得分离菌 118 株, 需氧菌(含兼性厌氧菌)和厌氧菌各 59 株, 平均每人 5.9 株, 需氧菌和厌氧菌各 2.95 株。22 例胃镜检查患者(男性 12 名, 女性 10 名, 平均年龄 38 岁)共得分离菌 94 株, 需氧菌 61 株, 厌氧菌 33 株, 平均每人 4.27 株, 厌氧菌 1.5 株, 需氧菌 2.77 株。食管癌病人术前 3 天和术后 7 天加用抗厌氧菌制剂灭滴灵以后, 吻合漏的发生率, 由本院过去同类手术的 5% 降至 1.2%。

关键词 食管癌; 厌氧菌; 拟杆菌属; 厌氧球菌; 梭杆菌属; 革兰氏阳性无芽孢厌氧杆菌

* 本人现在工作单位在南京儿童医院检验科

食管癌手术有很高的死亡率,其中最少50%以上的死者是由吻合术漏引起的^[1]。吻合术漏发生的原因有技术性的,也有感染性的。当发生感染的时候,除需氧菌之外,厌氧菌也是值得考虑的一种因素。正常成人食管虽有来自唾液和食物的微生物^[2],但其数量远较胃肠道下段微生物数量少得多。当患食管癌和食管发生狭窄或堵塞,食管便成为口腔菌的贮藏所^[3]。

材料与方法

(一) 标本采集

本研究包括20例食管癌手术的连续病人(腺癌8例,鳞状上皮癌12例)和22例无食管疾病的胃镜检查患者。食管癌病人是在打开胸廓切除癌肿之后,取食管近端粘膜1小块(直径3—5 mm)作标本;胃镜检查患者是在作胃镜检查时,钳取食管中段粘膜2—3块(每块直径约1 mm)作标本。两种来源不同的标本皆放置厌氧标本运输瓶(经过高压灭菌,三次抽气换气,最后灌进无氧CO₂的标本收集瓶)内,迅速送往实验室。

(二) 培养基

将标本取出放入无菌玻璃匀浆器内并加少许(约2 ml)硫乙醇酸盐肉汤,研磨成匀浆。用毛细滴管吸取匀浆接种下列培养基:①绵羊血琼脂平板(BA),②麦康凯琼脂平板(MC),③GAM琼脂平板或脑心浸液琼脂平板(BHI),④Bd平板(拟杆菌选择培养基),⑤冻溶血GAM琼脂平板,⑥硫乙醇酸盐肉汤。接种后,BA和Mc置普通孵育箱内作需氧培养;GAM或BHI、Bd、冻溶血GAM和硫乙醇酸盐肉汤置厌氧孵育箱内作厌氧培养。

(三) 细菌的分离与鉴定

需氧孵育24小时后,凡在麦康凯琼脂平板上生长的菌落类型皆接种Kligler氏铁琼脂,作初步鉴定,再接种生化反应管,作进一步鉴定。血平板上生长的革兰氏阳性球菌需区分是葡萄球菌、链球菌和微球菌等,革兰氏阳性杆菌一般不作进一步鉴定。

厌氧孵育48—72小时的平板,首先观察每

个平板含有几种类型的菌落,记下各类菌落的形态,大小,颜色,透明度,以及凸凹、颗粒、边缘和扩散等情况,然后进行分离、耐氧试验和涂片革兰氏染色。分离一般采用GAM或BHI平板;耐氧试验采用BA平板。

用作耐氧试验的BA平板在普通孵育箱内孵育24—48小时后观察结果。耐氧试验阳性者(有生长)为非专性厌氧菌,不再鉴定。耐氧试验阴性者为专性厌氧菌,需作进一步鉴定。对照涂片革兰氏染色反应,如果耐氧试验阴性的菌落类型是球菌,则不论是革兰氏阳性还是阴性皆按厌氧球菌的生化反应进行鉴定。如果是革兰氏阳性的杆菌,则按革兰氏阳性杆菌一套生化反应进行鉴定。如果是革兰氏阴性杆菌,则先分群然后定种^[4]。

从1985年起,我们对82例食管癌手术的病人,除常规应用青霉素(2次,每次80万单位)、链霉素(2次,每次0.5 g)和庆大霉素(2次,每次8万单位,对青链霉素过敏者适用)外,还加用抗厌氧菌的药物——灭滴灵(术前3天口服每天3次,每次0.2 g。不能进食的病人,术前静脉点滴2次,每次500 mg)作术前准备,术后继续使用灭滴灵7天,每天2次,每次500 mg,静脉滴注。

其中28例在术中按前法采集食管粘膜标本,进行需氧菌和厌氧菌的检查,以了解用药后厌氧菌的动态。

结 果

(一) 20例食管癌患者中需氧菌和厌氧菌分离结果

从20例病人中共得分离菌118株,需氧菌(含兼性厌氧菌)和厌氧菌各59株,平均每人5.9株,需氧菌和厌氧菌各2.95株。最常遇见的需氧菌是球菌共33株(革兰氏阳性球菌24株,阴性球菌9株),占全部需氧菌的56%,其次是革兰氏阴性杆菌共19株,占全部需氧菌的32%(表1)。在厌氧菌中,以拟杆菌属为最多见,共26株,占全部厌氧菌的44%,其次是厌氧球菌16株(28%),革兰氏阳性厌氧杆菌13

表 1 从 20 例食管癌病人中获得需氧菌的分布

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	合计
葡萄球菌		+															+				2
链球菌		+	+	+	+	+		+					+		+	+		+	+	+	12
肠球菌													+							+	2
微球菌		+	+	+			+		+						+			+		+	8
黄色奈色氏球菌	+						+	+	+			+									5
卡它奈色氏球菌												+									1
卡它布兰汉氏球菌										+			+	+							3
克雷伯氏杆菌	+									+			+		+	+		+	+		7
大肠杆菌										+							+				2
蜂房哈夫尼菌																			+		1
其他革兰氏阴性杆菌							+		+	+	+		+	+		+		+	+	+	9
革兰氏阳性杆菌		+					+							+						+	4
酵母菌					+										+	+					3
合 计	2	4	2	2	2	1	4	2	3	4	1	2	5	3	4	4	2	3	4	5	59

株(22%),梭杆菌 4 株(6.8%)(表 2)。

从每个病人皆能分离到需氧菌 1—5 株。有 2 例(8 和 17)未分到厌氧菌。在分离到厌氧菌的病人中,获得分离菌 5 株以上的 5 人(28%), 3 株以上的 5 人(28%), 1 株以上的 8 人(44%)。

(二) 22 例无食管疾病者中需氧菌和厌氧菌分离结果

从 22 例无食管疾病的胃镜检查患者中共分离到 94 株,需氧菌(含兼性厌氧菌) 61 株,厌氧菌 33 株,平均每人 4.27 株,厌氧菌 1.5 株,需氧菌 2.77 株。最常见到的需氧菌也是球菌(36 株),其次是革兰氏阴性杆菌(13 株)。在厌氧菌中,以厌氧球菌最多见,共分离到 20 株,占 60%,其次是拟杆菌 10 株,占 24%(表 3)。

试验组的 82 例病人发生吻合漏者仅 1 例,平均发烧天数 7.65 天(根据 20 例的统计),白血球数在一周内降至正常者 11 例占 55%(根据 14 例的统计)。

对照组的 100 例病人(1980—1984 年,以同样条件:仅用青链霉素,不用灭滴灵;同样方法:经左胸腔食管-胃端侧套入式吻合术)发生吻合漏者 5 例,平均发烧天数 10.14 天(根据 20 例统计),白血球数一周内降至正常者仅 3 例(21%)。

使用灭滴灵后厌氧菌的检出率也明显下降。28 例进行厌氧培养的病例,16 例阴性(57.14%),12 例阳性(42.86%)。共分离出厌氧菌 15 株,平均每人 0.54 株。其中拟杆菌 9 株,厌氧球菌 3 株,革兰氏阳性厌氧杆菌 3 株。

讨 论

1. 我们的工作是从证明食管癌病人的食道粘膜含有种类繁多的厌氧菌开始的。正常的食管粘膜是否也含有如此众多的厌氧菌呢?我们选择无食管疾患的胃镜检查患者,手术时钳取 2—3 块食管粘膜作标本。这种标本的检查结果能否代表正常食管的正常菌群,固然有待进一步研究,但最少可说明两点:①正常人的食管并不是无菌的;②菌群来自口腔。韦荣氏球菌是唾液中存在的主要细菌,1 毫升唾液含有 10^7 — 10^9 细菌,其中主要是韦荣氏球菌。22 例胃镜检查患者即有 9 例分离出本菌种。胃八叠球菌本是胃内存在的厌氧菌,正常情况下这种细菌是不会在食管出现的,但胃镜检查患者,由于插管引起胃痉挛,这种细菌便逆行到食管。

2. 食管发生癌肿时,由于堵塞,通过唾液或食物进入食管的细菌便存留下来,甚至生长繁殖。20 例食管癌的病人虽然需氧菌的检出情况与 22 例无食管疾患者没有什么区别,但两者

表 2 从 20 例食管癌病人中获得厌氧菌的分布

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	合计
拟杆菌属																					
普通拟杆菌			+			+	+														3
单形拟杆菌						+															1
中间型拟杆菌		+																			1
狄氏拟杆菌		+																			1
不解糖拟杆菌	+																				1
栖瘤胃拟杆菌短亚种									+	+										+	3
栖瘤胃拟杆菌瘤胃生亚种									+									+			2
口腔拟杆菌												+			+						2
锐利拟杆菌																+					1
其他拟杆菌	+++ ++	+				+					+	+	++								11
梭杆菌属																					
具核梭杆菌						+			+	+											3
变形梭杆菌														+							1
厌氧球菌																					
解糖消化球菌					+		+		+												3
黑色消化球菌									+					+							2
不解糖消化球菌																					1
微小消化链球菌						+										+					1
延展消化链球菌										+											1
中间型链球菌						+					+	+									3
韦荣氏球菌				+					+					+	+					+	5
革兰氏阳性厌氧杆菌																					
龋齿放线菌							+									+					2
内氏放线菌																		+			1
放线菌属菌种			+																		1
丙酸杆菌属菌种		+																			1
长双歧杆菌										+											1
迟缓真杆菌														+							1
其他		+++		+	+															+	6
合 计	6	7	2	2	2	6	3	0	6	4	2	3	2	4	2	3	0	1	1	3	59

表 3 22 例无食管疾患的胃镜检查患者的菌群分布

需 氧 菌		厌 氧 菌	
细菌名称	株数	细菌名称	株数
球菌		球菌	
卡他球菌	7	小韦荣氏球菌	9
链球菌	14	延展消化链球菌	4
四联球菌	6	四联消化链球菌	3
微球菌	5	厌氧消化链球菌	1
葡萄球菌	2	普氏消化链球菌	1
八叠球菌	2	卵形瘤胃球菌	1
革兰氏阳性杆菌		胃八叠球菌	1
棒状杆菌	2	革兰氏阳性杆菌	
芽胞杆菌	4	不解乳真杆菌	1
其他	4	迟缓真杆菌	1
革兰氏阴性杆菌		颗粒丙酸杆菌	1
大肠样细菌	5	革兰氏阴性杆菌	
变形杆菌	3	坏死梭杆菌	1
多形模仿杆菌	1	变形梭杆菌	1
其他	4	普通拟杆菌	1
酵母菌	2	3452A 类似群	2
		赖氏拟杆菌	2
		产黑素拟杆菌	1
		锐利拟杆菌	1
		侵肺拟杆菌	1
合 计	61	合 计	33

厌氧菌的检出情况却有明显差异 ($P < 0.05$) (表 4)。

正因为食管癌病人的食管粘膜含有种种需氧菌和厌氧菌, 因此对于准备进行食管癌手术的病人, 术前和术后只用抗需氧菌的药物是不够的, 还需添加抗厌氧菌的药物。这样, 可以大大减少食管粘膜厌氧菌的出现率(由 90% 降至 42.86%)和吻合漏的发生率(5—1.2%) (表 5)。

表 4 无食管疾患者与食管癌患者的食管粘膜细菌检出率(%)

菌 种	无食管疾患者	食管癌患者
需氧菌(含兼性厌氧菌)		
革兰氏阳性球菌	80	75
革兰氏阴性球菌	41	45
革兰氏阳性杆菌	46	25
革兰氏阴性杆菌	55	60
酵母菌	9	15
总检出率	91	95
厌氧菌		
革兰氏阳性球菌	50	45
革兰氏阴性球菌	41	25
革兰氏阳性杆菌	14	45
革兰氏阴性杆菌	41	90
总检出率	59	90

表 5 对食管癌手术病人用和不用灭滴灵的情况比较

灭滴灵	厌氧菌培养阳性率 (%)	平均每例检出厌氧菌株数	吻合漏发生率 (%)	术后体温降至正常平均天数	白细胞数术后一周内恢复正常 (%)
使用者	42.8	0.54	1.2(1/82)	7.65	79
不用者	90	2.95	5(5/100)	10.14	3

参 考 文 献

- [1] Hermreck As, et al.: The esophageal anastomotic leak, The American Journal of Surgery, 132: 794—798, 1976.
- [2] Jawetz E, et al.: Review of Medical Microbiology, 14th Ed. pp 285, Lange Medical Publications, 1980.
- [3] Finlay IG, et al.: Microbial flora in carcinoma of oesophagus, Thorax 37: 181, 1982.
- [4] Lennette EH, et al.: Manual of Clinical Microbiology 4th Ed. 445—472, American Society For Microbiology, Washington D. C., 1985.