- 的研究[J]. 中国医科大学学报, 2003, 27(4): 350-352.
- [5] 赵洁, 贾玫. 尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶在检测早期肾损害中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2012, 30(11): 2066-2068.
- [6] 刘涛, 田少江. 联合尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶和血半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 检测在糖尿病肾病早期诊断中的意义[J]. 中国医师进修杂志, 2010, 33(1): 22-24.
- [7] 罗金丽, 郑香花. 血清胱抑素 C 与尿微量清蛋白检测在糖尿病肾

病早期诊断中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(15): 2045-2046.

- [8] 陈燕, 赵敏. 尿微量蛋白检查对糖尿病早期肾损伤的诊断价值[J]. 中华医学检验杂志, 2003, 26(5): 562-564.

(收稿日期: 2014-06-19)

• 经验交流 •

不同月龄婴儿肠道微生态改变的临床研究

贺锐, 张翀, 赵翠生, 叶萍

(甘肃省妇幼保健院检验科, 甘肃兰州 730050)

摘要:目的 通过应用荧光定量 PCR 技术对不同月龄的正常婴儿、轮状病毒(RV)肠炎患儿肠道微生态进行动态检测, 分析其肠道菌群变化, 为临床提供数据参考。方法 采用病例对照研究, 选取不同月龄健康婴儿及 RV 肠炎患儿为研究对象, 运用荧光定量 PCR 技术测定细菌的 16SrRNA, 对不同月龄健康婴儿和 RV 肠炎患儿粪便中双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌、大肠杆菌进行定量分析。结果 不同月龄婴儿肠道中双歧杆菌和肠球菌数量随月龄变化差异有统计学意义($P < 0.05$), 乳酸杆菌和大肠杆菌数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。RV 肠炎患儿肠道中双歧杆菌和乳酸杆菌含量在不同月龄阶段均低于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 大肠杆菌和肠球菌含量仅在 3 月龄阶段低于健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在 6 月龄和 10 月龄婴儿与健康对照组婴儿比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 不同月龄婴儿的肠道微生态存在差异, 客观评判婴儿肠道微生态需建立不同月龄的肠道微生态参考区间。RV 对患儿肠道中益生菌的数量影响较大。

关键词: 不同月龄; 婴儿; 肠道微生态

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.069

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)24-3443-03

肠道是人体重要的消化器官, 定植于肠道内的大量固有菌群所构成的肠道微生态系统是其重要的组成部分, 婴儿肠道微生态系统对其代谢、免疫系统的发育和成熟等过程起着十分重要的作用^[1]。本研究采取病例对照研究设计, 运用细菌涂片、轮状病毒(RV)检测、16SrRNA 荧光定量 PCR 分析等检测手段, 对不同月龄健康婴儿、RV 肠炎患儿肠道中主要细菌进行定量分析, 并进行比较, 以了解婴儿肠道菌群变化。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 7 月至 2013 年 3 月在甘肃省妇幼保健院就诊的婴儿作为目标研究人群。

1.2 对照组纳入标准 近 4 周内未使用抗菌药物, 未使用微生态制剂且无胃肠道症状的 3 月龄、6 月龄及 10 月龄的健康婴儿各 30 例为研究对象。

1.3 病例组纳入标准 依据《婴幼儿腹泻诊断标准》诊断的 RV 腹泻的 3 月龄、6 月龄及 10 月龄患儿各 30 例为研究对象。

1.4 标本的采集与处理

1.4.1 标本的采集与存储 取新鲜粪便标本置无菌杯内, 立即送检, 进行培养接种, 涂片及 RV 检测, 剩余标本用无菌干燥管储存, -80°C 冰箱保存备用。

1.4.2 肠道细菌 DNA 的提取 取复融粪便 1 g 加 1 mL 的 PBS(0.05 mol/L, pH 7.4) 充分颠倒混匀 5~10 min, 然后低速离心(2 000 r/min)5 min, 取上清液, 上述过程重复 3 次, 收集上清液, 高速离心(13 000 r/min)3 min 后取沉淀, 沉淀的细菌用 PBS 液洗 4 次, 水洗 1 次, 后加 50 μL 蒸馏水悬浮细菌及 50 μL 1% TritonX-100 破碎菌体, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 立即放入冰水中冷却^[2]。

1.4.3 PCR 引物 引用文献所用引物, 对所选用引物序列分别与 4 种细菌 16SrRNA 的全序列在 BLAST 数据库(www.

ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行了比较验证, 4 种细菌上下游引物如下: (1)双歧杆菌^[3]: CTC CTG GAA ACG GGT GG; GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A, 扩增片段为 550 bp。(2)乳酸杆菌^[4]: AGC AGT AGG GAA TCT TCC A; ATT TCA CCG CTA CAC ATG, 扩增片段为 380 bp。(3)肠球菌^[5]: TCC ACG CCG TAA ACG ATG AG; GAC ACG AGC TGA CGA CAA CC, 扩增片段 274 bp。(4)大肠埃希菌^[6]: GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CC; CCC AAC ATT TCA CAA CAC G, 扩增片段 317 bp。

1.4.4 荧光定量 PCR 反应体系 采用 25 μL 反应体系, 包括 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , 4 $\times$ dNTP(0.25 mmol/L)2 μL , MgCl₂(25 mmol/L)2.5 μL , 上下游引物(0.25 $\mu\text{mol/L}$)各 0.25 μL , Taq 酶(1 u/ μL)0.75 μL , DNA 模板 3 μL , 荧光染料 SYBR green 2.5 μL , 水 11.25 μL 。应用 Mx3000p 型荧光定量 PCR 仪进行扩增与分析。

1.4.5 PCR 反应条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 87 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 共 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 延伸后结束; 60 $^{\circ}\text{C}$ ~95 $^{\circ}\text{C}$ 作溶解曲线。

1.4.6 标准曲线制作 分别纯化上述 PCR 反应过程中得到的 4 种细菌 PCR 产物, 具体步骤如下: 在 DNA 溶液中加入 1/10 体积 3 mol/L, pH 5.2 的乙酸钠, 在旋涡混合器上稍加振荡或用手指轻弹离心管壁几次使之混匀, 加入 2~2.5 倍体积的无水乙醇, 振荡混匀并置于冰上 30 min, 2 000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 颠倒混匀离心弃上清液, 干燥沉淀。将干燥沉淀物溶于适当体积的无菌水或 TE 缓冲液即成。在分光光度仪上测定出 4 种细菌纯化产物的 A 值。参照分子克隆, 1 个 A 双链 DNA 片段(1KB)相当于 4.74×10^{13} 分子/mL, 计算出每毫升 PCR 产物中所含的拷贝数, 然

后做 10 倍系列稀释,使其形成 $10^8 \sim 10^4$ 拷贝/mL,按上述条件进行荧光定量 PCR,形成标准曲线。

1.4.7 细菌产物的验证 通过对 4 种细菌标准菌株做荧光定量 PCR,利用溶解曲线比较产物 TM 值与标准菌株 TM 值,经验证,肠道菌群 PCR 扩增产物为双歧杆菌、乳酸杆菌、大肠杆菌和肠球菌的特异性产物。

1.4.8 敏感性测定 通过对上述 4 种细菌标准菌株菌落做系列稀释($10^8 \sim 10^2$ 个细菌)后行荧光定量 PCR,证明少至 100 个细菌仍有特征性曲线生长,说明用上述引物通过荧光定量 PCR 检测上述 4 种细菌有较好的检测灵敏度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

病例组和对照组基本情况比较结果见表 1、2。

表 1 病例组和对照组基本情况比较

变量	病例组(n=180)	对照组(n=90)	P 值
分娩方式(顺产/剖宫)(例)	101/79	53/37	>0.05
胎龄(周)	38±2	38±2	>0.05
出生体质量(g)	3 250±259	3 249±338	>0.05
性别(男/女)	97/83	49/41	>0.05
母亲身体状况(健康/疾病)	135/45	68/22	>0.05
喂养方式(母乳/其他)	113/67	59/31	>0.05

表 2 健康婴儿(对照组)不同月龄 4 种细菌变化趋势分析(logcopies/g)

细菌	3 月龄 (n=30)	6 月龄 (n=30)	10 月龄 (n=30)	r	P 值
双歧杆菌	5.79±2.67	6.36±2.72	6.84±2.92	0.45	0.028
乳酸杆菌	3.67±1.54	3.89±1.74	3.67±1.77	0.12	0.168
大肠杆菌	4.67±1.78	5.25±1.67	4.75±1.95	0.15	0.149
肠球菌	3.87±2.67	4.84±1.87	4.97±1.73	0.29	0.045

表 3 不同月龄阶段 RV 腹泻和对照组肠道 4 种细菌数量比较(logcopies/g)

细菌	组别	3 月龄	6 月龄	10 月龄
双歧杆菌	病例组(n=30)	2.12±1.34	2.72±1.57	3.01±2.54▲▲
	对照组(n=30)	5.79±2.67**	6.36±2.72**	6.84±2.92**
乳酸杆菌	病例组(n=30)	2.25±1.48	3.00±1.98	3.21±1.50▲
	对照组(n=30)	3.67±1.54**	3.89±1.74*	3.67±1.77*
大肠杆菌	病例组(n=30)	4.27±1.81	4.99±1.81	4.52±1.95
	对照组(n=30)	4.67±1.78*	5.25±1.67	4.75±1.95
肠球菌	病例组(n=30)	4.08±2.52	4.64±1.87	4.69±1.99
	对照组(n=30)	4.57±2.67*	4.84±1.87	4.97±1.73

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$,不同月龄病例组与对照组的比较;▲▲ : $P < 0.01$,▲ : $P < 0.05$,病例组各细菌含量与月龄变化的相关关系。

3 讨 论

本研究为病例对照研究,纳入研究的 2 组间在大便收集时间点、抗菌药物治疗、喂养方式、分娩方式、胎龄、出生体质量、

性别及母体身体状况等方面差异无统计学意义,两组数据具有可比性。

肠道微生态的平衡对婴幼儿的生长发育有着十分重要的作用,人类出生后数小时,菌群初级演替,胃肠道细菌就会出现,此后经过生理演替和次级演替至峰顶群落阶段,婴儿后期至断乳后,肠道菌群结构趋于稳定,这种状态维持整个儿童期和青壮年期^[7]。婴儿期处于次级演替过程,其肠道内生环境、定植抗力及免疫功能尚不稳定,故肠道微生态的平衡稳定性差,容易受诸多因素的影响,婴儿肠道菌群处于生理性的演替过程,肠道免疫功能还不够健全,易发肠道菌群紊乱,而月龄是一个不容忽视的内在因素。本研究从该目的入手,分析了 3 月龄、6 月龄以及 10 月龄阶段健康婴儿肠道 4 种主要细菌数量随月龄增长的变化趋势,统计显示粪便中双歧杆菌和肠球菌含量在婴儿期随月龄的增加有升高趋势,与婴儿月龄呈明显正相关关系,乳酸杆菌和大肠杆菌含量在婴儿期与月龄增加的关系不大,基本处于稳定状态。因此,可见不同月龄阶段健康婴儿的肠道微生物菌群在种类和数量上可能存在差异,因而客观评判腹泻婴儿肠道微生态就需要建立不同月龄阶段的肠道菌群参考区间。

RV 腹泻病是婴幼儿腹泻的主要病因,占有肠道感染病因的 50% 以上^[8],RV 肠炎加重婴儿肠道菌群失调。本研究通过分析显示,轮状病毒所致腹泻婴儿粪便中双歧杆菌和乳酸杆菌含量明显低于同月龄健康对照组,差异有统计学意义,而大肠杆菌和肠球菌的含量无明显差别。其机制可能与下列因素有关:轮状病毒腹泻以水样便多见,且次数较多,因此随排便带走的肠道细菌也较多,加之肠蠕动的增强破坏了厌氧环境,不利于厌氧菌的繁殖^[9];同时 RV 性腹泻时肠上皮细胞受损,细胞结构破坏,小肠绒毛缩短,益生菌与肠上皮细胞的黏附力减弱,肠内容物快速通过肠腔,导致大量的益生菌排除肠道,从而导致以上结果的发生。

腹泻是导致婴儿短期肠道微生态失衡的主要因素,如果不能及时纠正将对婴儿的生长发育带来不良影响。婴儿期肠道微生物菌群正处于演替阶段,客观评价腹泻婴儿肠道微生态,对其疾病的治疗及恢复有着重要的意义,但由于影响婴儿肠道微生态的因素较多,本研究结果可能存在片面性,还需今后进一步去探究。

参考文献

[1] 康白. 胃肠微生态系统的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2006, 26(9):961-963.

[2] 杨美芬,王玉明,黄永坤,等. 用细菌 16SrRNA 荧光定量 PCR 法检测肠道菌群变化[J]. 中国微生态杂志, 2006, 18(4):266-269.

[3] Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. Enterobacteria mediated nitrogenfixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata* [J]. Mol Ecol, 2005, 14(26):2637-2643.

[4] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(12):7220-7228.

[5] Gill, S. R. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome[J]. Science, 2006, 312:1355-1359.

[6] 张小贤,钱香,楼正青,等. 16SrRNA 实时荧光定量 PCR 检测肠道菌群的研究[J]. 中国高等医学教育, 2010, 6(1):128-144.

[7] 毛萌. 儿童肠道微生态系统的特点与疾病[J]. 临床儿科杂志,

2005,23(6):679-682.

果的循证评价[J]. 临床儿科杂志,2005,23(4):486-488.

[8] 李燕红,杜敏联. 婴幼儿轮状病毒肠外感染及免疫研究新进展 [J]. 国外医学:儿科学分册,1998,25(1):145-147.

(收稿日期:2014-06-17)

[9] 朱渝夏,嘉陵,邓建军,等. 微生态药物对急性感染性腹泻治疗效

• 经验交流 •

指数平滑法在临床用血管理中的应用

刘建峰,张立川,王书华

(首都医科大学大兴医院输血科,北京 102600)

摘要:目的 在临床用血管理中,为了提高用血计划制订的科学性,探讨指数平滑法的应用价值。方法 根据 2005 年 1 月至 2013 年 12 月临床用血统计数据,利用 SPSS17.0 中 Forecasting 功能模块筛选最佳预测模型,采用平稳的 R 方对模型的拟合优度进行评价,计算最优平滑系数并预测。结果 悬浮红细胞、新鲜冰冻血浆以及机采血小板 3 种血液成分平稳的 R 方分别为 0.610、0.614 与 0.654,模型类型属于简单季节性,平滑系数 α 均为 0.30。结论 指数平滑法作为定量预测方法,提高了预测结果的精确性,为临床用血管理工作提供了一种有效的方法。

关键词:指数平滑法; 预测; 临床用血; 用血计划

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.070

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)24-3445-03

输血科的临床用血管理工作,与血液库存管理和血液预订工作密不可分,每年都需要与采供血机构签订临床供血服务协议,其中重要的核心内容,就是对下一年度用血计划的拟定,从而为采供血机构采血计划提供依据。传统的方法是根据以往的数据凭个人经验制订,属于定性预测方法范畴。指数平滑法(exponential smoothing, ES)是一种广泛应用于经济领域的预测方法,其预测的基础模型为: $Ft+1 = \alpha Xt + (1-\alpha)Ft$,属于定量预测方法^[1]。为了提高临床用血计划的科学性,笔者根据既往临床用血统计数据,应用 SPSS17.0 中的指数平滑模型对 2014 年度用血量进行预测,提高了预测的精确性,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2005 年 1 月至 2013 年 12 月临床用血数据,包括悬浮红细胞、新鲜冰冻血浆和机采血小板,计算方法按照卫生部规定全血 200 mL 为 1 个单位(U),成分血以 200 mL 全血分离制备为 1 U,机采血小板 1 个治疗量为 1 U,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 原始数据导入 在 SPSS17.0 中导入数据,点击 File→Open→Data,文件类型选择 Excel,选择需要导入的原始数据文件。

表 1 本院 2005 年 1 月至 2013 年 12 月临床用血统计数据

年份	血液种类	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2005	红细胞	226	160	273	308	246	274	314	371	348	320	377	293
	血浆	113	79	113	148	93	169	185	174	170	185	245	130
	血小板	11	21	7	16	15	9	15	20	11	16	14	12
2006	红细胞	280	243	258	333	235	213	249	270	331	256	319	404
	血浆	133	145	259	341	214	196	214	242	384	238	348	424
	血小板	9	9	16	24	23	19	25	25	18	20	19	26
2007	红细胞	484	258	350	369	381	398	405	401	365	347	427	422
	血浆	497	270	470	321	339	322	386	241	130	213	430	469
	血小板	10	22	16	30	37	30	32	26	30	21	30	27
2008	红细胞	344	375	491	523	554	535	506	323	453	408	480	564
	血浆	251	303	459	553	496	580	561	373	497	510	520	573
	血小板	37	21	38	47	33	42	44	19	38	15	18	45
2009	红细胞	495	362	337	449	450	578	574	480	481	566	449	403
	血浆	469	407	376	507	553	709	446	567	446	499	504	467
	血小板	23	26	16	8	8	14	19	13	31	19	9	7
2010	红细胞	371	387	409	458	432	436	418	563	570	562	624	494
	血浆	466	391	519	678	561	523	499	664	646	626	799	658
	血小板	8	21	22	21	11	13	17	19	13	22	20	16
2011	红细胞	470	337	589	594	455	546	483	591	504	432	437	455
	血浆	488	328	586	766	483	412	533	629	558	472	351	570