

宫颈癌患者放疗前后乳酸菌的变化及药敏分析

张彩霞¹; 苟占彪²; 车团结^{3*}; 张莹³; 冯海霞³

1. 兰州大学第一医院妇产科, 甘肃, 兰州, 730000; 2. 甘肃省中医院重症医学科, 甘肃, 兰州, 730050; 3. 甘肃省生物芯片工程实验室, 甘肃, 兰州, 730000

摘要:目的: 调查妇科宫颈癌患者术后放疗前后, 阴道分泌物中乳酸菌的分布情况及对4种抗生素的耐药性, 为预防和治疗继发感染提供实验依据。**方法:** 采用细菌培养法, 对阴道分泌物标本中乳酸菌进行检测, 并进行药敏实验, 分析放疗前后乳酸菌检测结果的差异性。**结果:** 放疗前乳酸菌的检出率为76.98%, 放疗后乳酸菌检出率45.24%, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。乳酸菌对甲硝唑、庆大霉素、阿米卡星、头孢噻肟钠的体外抑菌效果: 头孢噻肟钠耐药性最低, 其他依次是阿米卡星、庆大霉素、甲硝唑, 耐药率分别为4.7%、5.8%、76.8%、84.5%。**结论:** 宫颈癌术后放疗可影响阴道的微生态平衡, 这可能是导致宫颈癌术后放疗患者发生感染的重要原因之一; 由于乳酸菌对甲硝唑的耐药率最高, 可认为在预防放疗后的阴道炎感染时, 甲硝唑对阴道益生菌的影响不大, 应作为首选药。乳酸菌对头孢噻肟钠最敏感, 临床在治疗阴道感染时, 需要注意避免使用该药物。

关键词: 宫颈癌; 放疗; 乳酸菌; 抗生素; 耐药性

Study the changing of lactic acid bacteria and drug sensitivity analysis pre and post chemotherapy in patients with cervical cancer

ZHANG Cai-xia¹, GOU Zhan-biao², CHE Tuan-jie^{3*}, ZHANG Ying³, FENG Hai-xia³
Lanzhou university's First Hospital, Lanzhou 730000, china

Abstract: Objective : In this study, we investigated the existence of lactobacillus in the vaginal discharge of the postoperative cervical cancer patients before-and-after radiation therapy , and the resistance of lactobacillus to 4 antibiotics, to provide evidences for preventing and treating the secondary infections after operation for cervical cancer. **Methods:** A germiculture method was employed. Lactobacillus from the vaginal discharge samples of the cervical cancer patients before and after radiation therapy were cultured for statistic and drug sensitive test. **Results:** The detection rate of lactobacillus before radiation therapy was 76.98%, higher than that after radiation therapy (45.24%), The result was statistically significant ($P < 0.05$). The resistance of lactobacillus to 4 antibiotics in vitro were, cefotaxime sodium 4.7% , amikacin 5.8%, gentamycin 76.8%, metronidazole 84.5%, respectively. The result showed that lactobacillus was most sensitive to cefotaxime sodium and was most resistant to metronidazole. **Conclusion:** Radiation therapy after cervical cancer operation leads to micro-ecological imbalance in vagina, which may play a key role in the secondary infections of postoperative patients. Our study implicated that metronidazole can be the first choice to prevent infections after radiation therapy because of the high resistance of probiotics such as lactobacillus to it, and cefotaxime sodium should be avoided in treatment for vaginal infections.

Key words: Chemotherapy ; cervical cancer ; lactic acid bacteria ; Antimicrobial ; Drug resistance

作者简介: 张彩霞, 女, 1979年生, 汉族, 出生地: 甘肃永登, 主治医师, 妇产科硕士, 主要从事妇科肿瘤的临床诊治及研究工作。

通讯作者: 车团结, 男, 甘肃省生物芯片工程实验室。通讯地址: 甘肃省兰州市城关区南面滩 268 号创新大厦 A 区 17 楼, 邮政编码: 730000, 电话: 13893487076, E-mail: chetj@126.com.

Corresponding author: CHE Tuan-jie E-mail: chetj@126.com.

宫颈癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一，严重威胁着女性的生命安全，近年来发病率呈上升和年轻化趋势。放射治疗为宫颈癌治疗普遍运用的手段，在宫颈癌高危病例和晚期复发转移患者的治疗中是必不可缺的。世界范围内约 80% 的宫颈癌患者的治疗措施中包括放射治疗^[1]，但其并发症影响患者的生存质量^[2]。乳酸菌是一类寄居于妇女阴道里的厌氧菌，在维持阴道自净及抗感染中起着关键作用，正常阴道菌群是以乳酸菌占优势的动态平衡系统，当乳酸菌的优势地位受到威胁的时候，就会罹患各种生殖道疾病^[3]。乳酸菌通过空间占位、营养竞争等机制制约着阴道内其他菌群的生长，维持阴道的内环境稳态。当机体内外环境发生变化并使阴道内各种微生物在数量、种类和比例上发生改变时，这种平衡状态就被打破，病原微生物即趁虚而入。宫颈癌放疗治疗破坏了阴道微生物的平衡，阴道正常菌群转化为高危度的致病菌，给患者带来了痛苦。本实验通过检查宫颈癌患者术后放疗前后阴道分泌物中乳酸菌的变化情况及乳酸菌的耐药试验，了解宫颈癌术后放疗患者阴道分泌物中乳酸菌的变化趋势及耐药情况，为预防和治疗继发感染提供实验依据。

1.对象与方法

1.1 研究对象

选择 2011 年 3 月~2013 年 3 月，在兰州大学第一医院、兰州市人民医院的宫颈癌术后放疗患者 126 例为研究对象，年龄 35~70 岁，平均 44.96 ± 5.33 岁，所有患者术前未进行过放疗、化疗；放疗前 2 周末使用过抗生素、激素或免疫制剂。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集

放疗前 1 日和放疗结束次日采样，使用一次性阴道扩张器扩张阴道，用一次性无菌拭子采集阴道深部、阴道后穹窿部以及阴道侧壁上三分之一处分泌物，一部分立即送检；一部分用于 PH 值测试。

1.2.2 阴道分泌物的 PH 值测定

PH 值测定采用 PH 精密试纸，将分泌物直接涂抹在试纸上，立即与标准比色卡对比，判断 PH 值。

1.2.3 细菌的培养与鉴定

按照叶应妩、朱建国等主编的《全国临床检验操作规程》（第三版）进行分离培养^[4]，标本接种于 MRS 固体培养基， $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 厌氧培养 48h 后，取适量菌经涂片、染色、镜检，观察菌落形态，本次试验只鉴定到属，即乳酸菌属。挑取单克隆在 MRS 培养基进行纯培养，二次挑取单克隆至含甘油的营养肉汤培养基中置于 -20°C 冰箱保存备用。

生化鉴定：取新鲜初步认定菌株分别进行产 H_2S 实验；过氧化氢酶接触试验；产氨试验，明胶液化试验，确定菌株是否为乳酸菌。

1.3 药敏试验

严格按照美国 临床试验标准研究所(CLSI) 抗细菌药物敏感试验的规范操作，本实验选择纸片扩散法，将细菌活化后用生理盐水稀释至约 $1.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ，用无菌棉拭子浸取已调好的菌悬液（在管壁内轻轻转压除去过多菌液）轻轻均匀涂抹到 MH 琼脂培养基表面，每一平皿涂抹三次，每次涂抹后均需将平皿转动 60° 再行下一次涂抹，最后沿平皿壁圆周涂抹一次，使细菌呈融合的菌苔生长。平皿于室温放置片刻，待培养基表面稍干后，用无菌镊子将药敏纸片均匀贴布于培养基表面，每个平板贴上甲硝唑、庆大霉素、头孢噻肟钠、阿米卡星药敏纸片，

每张纸片间距不少于 24mm，纸片中心距平皿边缘不少于 15mm。在菌接种后 15 分钟内贴完纸片。将平板反转，36±1℃孵育 18~24 小时后取出，用游标卡尺测量抑菌圈直径，从平板背面测量最接近的整数毫米数并记录。抑菌环的边缘以肉眼见不到细菌明显生长为限。

1.4 统计

使用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 t 检验，率的比较采用卡方检验。**检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)**。

2.结果

2.1 PH 值

宫颈癌患者术后放疗前阴道分泌物的平均 PH 值为 4.81±0.32；放疗后的阴道分泌物的平均 PH 值为 6.84±0.34 二者差异有统计学意义 (t=60.202, P=0.000) 。

2.2 乳酸菌检出率

标本经 37℃厌氧培养后，菌落形态主要有两种，一种为圆形乳白色菌落，大而凸起，表面光滑，边缘整齐；一种为暗棕色菌落，圆形微凸，表面干燥。格兰染色镜下观察，分离菌株革兰阳性，杆状，长短不一，部分弯曲，无芽孢。符合乳酸菌的染色及形态特征。乳酸菌在 MRS 固体培养基上 48h 培养产物：H₂S 实验；过氧化氢酶接触试验；产氨试验，明胶液化试验均为阴性。

本次共采集阴道分泌物 126 例，对放疗前的 126 例阴道分泌物经培养、分离、鉴定得到 97 株乳酸菌，其检出率为 76.98%；对放疗后的 126 例阴道分泌物经培养、分离、鉴定得到 57 株乳酸菌，其检出率为 45.24%。对宫颈癌患者术后放疗前和放疗后的乳酸菌进行卡方检验，，二者差异有统计学意义 (x²=26.716, P=0.000) 。见表 1。

2.3 药敏试验结果

57 株放疗后的妇科乳酸菌的药敏试验结果显示对甲硝唑的耐药率最高，头孢噻肟钠的耐药率最小，见表 1。

表 1 乳酸菌对四种抗生素的耐药性

抗生素	敏感 (%)	中介 (%)	耐药 (%)
甲硝唑	0.7	14.8	84.5
庆大霉素	22.0	1.2	76.8
阿米卡星	62.6	31.6	5.8
头孢噻肟钠	90.0	5.3	4.7

3.讨论

女性阴道是一个复杂的微生态系统，寄生着 50 多种微生物，其中最重要的乳酸杆菌，占 95%以上^[5]，其分泌的过氧化氢，抑制寄居的致病菌繁殖^[6,7],Hasslof 等^[8]设计体外实验研究 8 种乳杆菌对念珠菌的抑制作用，发现 8 种乳杆菌对念珠菌都有抑制作用。宫颈癌患者术后经历放疗后，阴道优势菌乳酸菌缺失导致菌群失调，阴道自洁能力下降，外来致病菌就会乘虚而入，在阴道内大量繁殖就会引起阴道发炎，使阴道 PH 值上升。因此，检测阴道 PH 值及分泌物中乳酸菌的数量可能不同程度地反映阴道生理及病理变化。现有的大量文献报道都集中在研究乳酸菌如何通过黏附癌细胞从而防治宫颈癌^[3,9]，而有关宫颈癌放疗之后阴道乳酸菌的含量变化及其对阴道致病菌影响

的关系很少有研究。本文的研究表明放疗之后阴道内的 PH 值由 4.8 上升到 6.8，乳酸菌的含量由 76.98%下降到 45.24%，因此可认为放疗会降低阴道内的乳酸菌含量，影响阴道的微生态平衡。乳酸杆菌减少或消失，革兰阴性菌和厌氧菌增多^[10]。因此需要合理有效的使用抗生素防止病菌感染。有调查结果表明，目前有较多妇女阴道微生态平衡受到破坏，无阴道乳酸杆菌标本的检出率达 62.91%^[11]，影响阴道乳酸杆菌生长繁殖的一个重要因素是抗生素广泛、不规则的使用，因此，能选择性抑制致病菌而不影响乳酸菌生长的抗生素才适用于细菌性阴道病的治疗^[12]。

甲硝唑是治疗阴道疾病的常见用药，针对滴虫性阴道炎和细菌性阴道病均有很好的疗效，可口服也可外用，在阴道炎患者中应用最为广泛。头孢噻肟钠为第三代半合成头孢菌素，抗菌谱比头孢呋肟更广，对生殖道感染有很好的疗效。阿米卡星是一种氨基糖苷类抗生素，治疗阴道炎和泌尿系统感染的效果良好，尤其对产后阴道口感染有很好的疗效^[13]。庆大霉素是一种氨基糖苷类抗生素，主要用于治疗细菌感染，对尿路生殖系统感染有很好的疗效。本研究使用的药物均对阴道炎或泌尿系统感染有着不同的疗效，研究阴道中的益生菌对这些药物的药敏作用为后续合理用药保护益生菌有着十分重要的借鉴意义。本实验中选取的宫颈癌术后患者放疗前后的乳酸菌数量有明显的变化，药敏试验结果显示在 4 种抗生素中，乳酸菌对甲硝唑的耐药率最高，可认为在预防放疗后的阴道炎感染时，甲硝唑对阴道益生菌的影响不大，应作为首选药。乳酸菌对头孢噻肟最敏感，临床在治疗阴道感染时，需要注意避免使用该药物。

参考文献:

- [1] 谷铎之，殷蔚伯，余子豪，等。肿瘤放射治疗学[M].北京：中国协和医科大学出版社，2008，：1007-50.
- [2] 吕银.宫颈癌放射治疗的现状[J].安徽医科大学学报，2011，46（6）：601-603.
- [3] 李小宁，贺丰杰。乳酸菌与宫颈癌防治的研究进展[J].医学研究与教育，2010，27（5）：77-79.
- [4] 叶应妩，王毓三，申子瑜. 全国临床检验操作规程，第三版[M].南京：东南大学出版社 1997.
- [5] 高文.乳酸菌对维持阴道微生态平衡的作用机理[J].现代妇产科进展，2008，17（5）：382-383.
- [6] 薛平海.健康妇女生殖道中产乳酸菌球菌的分离鉴定及其在维持菌群平衡中的作用[D].沈阳：辽宁师范大学，2004.
- [7] 孙文平，罗红，陈晨，等.健康妊娠妇女阴道乳酸杆菌及 PH 变化的研究[J].中国微生物学杂志，2011，23（3）：264-265.
- [8] Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, et al. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacillus in vitro study. BMC Oral Health, 2010, 10: 18.
- [9] 逯彩虹，程建新，周爱玲，等。多种乳酸杆菌黏附活性的比较[J].军医进修学院学报，2009，30（6）：893-895.
- [10] 祝莉，徐佑平.武汉地区 5854 例育龄妇女阴道分泌物病原菌检测情况[J].实用预防医学，2013，20（9）：1113-1115.
- [11] 卢芳国，胡建中，伍参荣，等。阴道乳酸杆菌生物拮抗作用的调查研究[J].实用预防医学，2001，08（01）：19-20.

- [12]SOO YOUNG CHO I CHUNG EUN CHANG,,SEUNG CHEOL K M,etal Antin icrobial susceptibility and strain prevalence of Korean vaginal Lactobacillus spp[J].Anaerobe,2003,9:277-280.
- [13] 吴旭红， 蒋红。肤阴洁洗液配合阿米卡星洗剂预防产后会阴切口感染的疗效观察[J].实用预防医学， 2012， 26（07）： 1867-1868.