

关于健康妇女阴道菌群的研究

江西省科学院微生物研究所 熊德鑫 苏鸿声 蔡杰 吴晓琴 黄晓蓉

如同肠道菌群一样, 妇女的阴道中也存在着一些常住菌, 它们在宿主的防御机制中发挥重要作用。如参加糖类的分解, 产酸, 使正常人阴道保持酸性环境, 抑制致病菌生长繁殖, 维持健康人阴道内的自净作用。另一方面, 这些常住菌也能成为条件致病菌, 引起自身感染。如当创伤, 手术或分娩时, 人体组织屏障破坏时, 或当卵巢功能低下时, 阴道菌群中一些常住菌乘虚而入, 引起女性生殖系局部炎症或周身感染。某些常住菌还可造成新生儿感染性严重疾病。如大肠杆菌和拟杆菌的混合感染, 以及B族链球菌等引起的新生儿败血症或脑脊髓膜炎等。因此开展阴道菌群的研究, 不仅可了解阴道常住菌的生理学意义, 而且有利于了解它的致病意义, 为妇产科和儿科提供有价值的病因学和防治上的参考。

材料和方法

一、标本: 40名育龄期和20名更年期, 经绝期健康妇女一月内无局部用药或口服药物。

以灭菌的结核菌素注射器, 在阴道四周壁旁吸取0.2ml排出物, 注入液体输送培养基1.8ml内, 即送实验室。

二、接种和培养: 摇匀输送用培养基, 以10倍递增法稀释, 取匀浆液各0.1ml, 分别滴入EMB、EC(肠球菌选择性)平板、链球菌选择性平板、棒状菌选择性平板和蔡氏平板、NBGT(拟杆菌选择性)平板、BL(乳杆菌选择性)平板、葡萄球菌选择性平板, 后各用一灭菌“L”玻棒均匀涂布。

NBGT和BL平板置于厌氧罐内以抽气换气法作厌氧培养。37℃ 48~72小时后, 观察初代培养并计数, 各种特征性菌落挑取3~5

个以上, 接种到非选择性血平板上, 一式二份, 一份作需氧培养, 另一份作厌氧培养, 凡需氧和厌氧培养都生长的为兼性菌, 3次以上需氧培养不生长厌氧培养才生长的鉴定为专性厌氧菌。

除NBGT和BL平板上生长的菌落外, 作常规需氧培养的菌以平板活菌计数, 并分纯鉴定。

三、乳杆菌和拟杆菌的鉴定: 包括菌落特征、菌体形态观察和革兰氏染色、作需氧培养对照, 葡萄糖等16种糖类酵解试验、明胶液化和吲哚产生、硝酸盐还原试验、胆汁耐性试验等。以从中国预防医学中心流研所和中国科学院微生物所菌种保藏委员会及国外引进的标准乳杆菌和拟杆菌作对照试验。

四、GLC(气、液相色谱分析 Gas-Liquid Chromatography)分析细菌代谢产物。以助乳杆菌和拟杆菌的鉴定: 将待检菌株的CMH培养基(Cooked meat with hemin medium)48小时厌氧培养物, 经VPI法或上野一惠推荐的方法提取后进行分析。

仪器: 岛津GC-7AG(FID)系统。色谱柱: 2m×3mm玻柱。填充剂Reoplex 400涂于Chromsorb-W(60~80)上。载气为氮气(N₂99.99%)。流量为30ml/min。燃气为氢气(H₂)流量35~40ml/min。助燃气为空气, 流量0.5ml/min。灵敏度10²。衰减(ATT): 32。进样量1~1.5μl/次, 纸速0.4mm/min。

结 果

一、40例育龄期和20例更年期、经绝期妇女阴道菌群中乳杆菌、拟杆菌、表皮葡萄球菌、α-链球菌、大肠杆菌、肠球菌、白色念珠菌

以及阴道的pH。在育龄期与更年期、经绝期两者间有显著差异，提示阴道菌群中上述几类常住菌的数量受宿主的卵巢激素(如雌激素)的影响。也反映出妇女生殖道粘膜的老化与她们的阴道菌群改变有关。故抗衰老或治疗更年期综合症时，宜注意调整阴道菌群。每毫升阴道分泌物中分离出活菌数 $10^2 \sim 10^8$ 。

二、乳杆菌和拟杆菌的鉴定列于表2(1)(2)。我们在乳杆菌和拟杆菌鉴定时应用GLC分析细菌的代谢产物。其中有关乳杆菌的，据Bergey's细菌学和户田新细菌学，将乳杆菌分为仅产生乳酸的同质乳酸杆菌类，和产生乳酸外还产生乙酸或丙酸等的异质乳杆菌两大部分。我们的结果已列表2(1)中。对拟杆菌我们参照VPI厌氧菌手册及伯捷氏细菌学，结果列于表2(2)中。

我们进一步对28株来自阴道和肠道的大肠杆菌、肠球菌、金黄色葡萄球菌、棒状杆菌、克雷伯氏菌、白色念珠菌等的代谢产物作了GLC分析，结果有少量乙酸、丙酸、乳酸、琥珀酸峰出现。而无异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸，因此可以说GLC分析菌的代谢产物主要对菌群中厌氧菌部分的鉴定和分类有较大价值，而对兼性需氧菌部分意义较小。这提示GLC分析菌的代谢产物有可能直接用于临床厌氧菌感染的快速诊断。

三、育龄期和更年期、经绝期妇女阴道排出物中分离的乳杆菌种及其比较列于表3。由表3可知，乳杆菌中最常见菌种是嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、发酵乳杆菌。其次是短乳杆菌、德氏乳杆菌等。两类妇女差异主要在嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌的检出上。而唾液乳杆菌等七种乳杆菌两者间差异不显著。提示维持阴道自净作用受宿主卵巢激素影响尤以嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌较著。乳杆菌总的分离率为81.7%。每份标本中最多可分离出5种乳杆菌。

四、育龄期和更年期、经绝期妇女阴道排泄物中分离的拟杆菌情况列于表4中。最常见菌种是可变拟杆菌和产黑色素拟杆菌。其次是

表1 从阴道排泄物分离的阴道菌群

类别	乳杆菌	拟杆菌	表皮葡萄球菌	α -链球菌	大肠杆菌	肠球菌	白色念珠菌	金黄色葡萄球菌	棒状杆菌	阴道pH
育龄期 (40例)	7.912 ± 1.856 (92.5)*	5.748 ± 2.980 (77.5)	6.432 ± 2.589 (95)	5.502 ± 1.854 (85)	4.403 ± 2.372 (95)	4.524 ± 1.544 (90)	3.686 ± 2.294 (85)			5.158 ± 1.346
更年期、经 绝期(20)例	7.143 ± 0.368 (60)	4.941 ± 0.598 (45)	8.398 ± 1.140 (80)	6.745 ± 1.512 (30)	4.644 ± 1.684 (75)	4.838 ± 1.162 (50)	4.459 ± 1.130 (70)	8.267 ± 1.192 (70)	4.893 ± 1.222 (75)	5.955 ± 0.980
显著性检验	$S_c^2 = 0.691$ $t = 2.786$ $P < 0.01$	$S_{CO} = 0.284$ $t = 2.84$ $P < 0.05$	$S_{CO} = 0.254$ $t = 7.732$ $P < 0.01$	$S_c^2 = 0.821$ $t = 3.1$ $P < 0.01$	$S_{CO} = 0.336$ $t = 0.717$ $P > 0.05$	$S_c^2 = 0.536$ $t = 1.199$ $P > 0.05$	$S_{CO} = 0.249$ $t = 3.104$ $P < 0.05$			$S_{CO} = 0.214$ $t = 3.724$ $P < 0.01$
均数 ± 2 标准差										

() 括号内数字，指分离率isolation rate

表 2(1)

乳 杆 菌

菌 种 Species	对照		葡 萄 糖	乳 芽 糖	麦 芽 糖	蔗 糖	阿 拉 伯 糖	木 糖	山 梨 醇	甘 露 醇	水 杨 苷	明 胶	七 叶 树 苷	核 糖	鼠 李 糖	海 藻 糖	棉 子 糖	GLC 分 析 结 果	纤 维 糖
	需 氧	厌 氧																	
嗜酸乳杆菌 <i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	L	-
唾液乳杆菌 <i>L. salivarius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	V	+	V	-	V	+	+	L	-
乳酸乳杆菌 <i>L. lactis</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	L	-
德氏乳杆菌 <i>L. delbrueckii</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
发酵乳杆菌 <i>L. fermentus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	LA	-
短乳杆菌 <i>L. brevis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	LA	-
布氏乳杆菌 <i>L. buchneri</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	LA	-
链状乳杆菌 <i>L. cateniforme</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	L	-
干酪乳杆菌 <i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	L	+

注：说明见表2(2)

B. bivius(两路拟杆菌)和*B. disicus*(迪氏拟杆菌)产黑色素拟杆菌和非解糖拟杆菌多见。两期妇女阴道排出物中拟杆菌菌种的差异不显著。每份标本中最多可分离出3种拟杆菌。

讨 论

关于阴道菌群的研究早在五十年代Laughton^[1]就曾报告分离到α-链球菌和棒状杆菌。并认为它们能发酵糖类产酸，使阴道pH降低。以后Mirris^[2]报告，271名育龄期健康妇女的阴道菌群主要分离到葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、棒状杆菌、肠球菌等，以后Gorbach(1973)^[3]、Corbishley(1977)^[4]以及近年大桥浩文(1980)^[5]报告，阴道菌群中大致包括26种类需氧菌(兼性菌)和厌氧菌，其中较常见菌类有：乳杆菌(*Lactobacterium*，分离率48~81%，下同)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis* 38.7%)、大肠杆菌(*E. coli* 22.1~60%)、棒状杆菌(*Corynebacterium* 18.9%)。肠球菌(粪链球菌*S. faecalis* 16.1%)、白色念珠菌(*Candida albicans* 12.4%)、拟杆菌(*Bacteroides* 12.4~57

%)、消化球菌(*Peptococcus* 12.9~33%)、α-链球菌(*α-Streptococcus* 8.3~70%)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus* 7.8~6.6%)等。本实验据此也分析了乳杆菌、拟杆菌等7~9类菌，并作了定量分析。Pratt^[6]等曾报告子宫全切手术后育龄期妇女比闭经期妇女感染率高，认为这与育龄期阴道细菌数量和种类多有关。青岛(1977)^[7]等报告有卵巢机能的妇女阴道菌群中常以乳杆菌为优势菌群，而无卵巢机能的妇女常无优势菌群。大桥氏报告^[5,8]，育龄期妇女的标本中检出细菌的种类和数量最多(几乎都检得26种类菌)，阴道pH低(4.4±0.6)，乳杆菌为优势菌群的个体占多数，而随年龄增加。到更年期(pH5.2±0.5)，经绝期(5.4±2.0)阴道pH渐升高，检出细菌的种类和数量都减少。且多数个体无优势菌群。故认为阴道菌群受卵巢机能的影响，尤其是受雌激素和阴道pH的影响明显。本实验结果与上述资料相引证。

据Bergey氏细菌鉴定手册^[9]和户田新细菌学^[10]分类和Fagnant^[15]意见，乳杆菌分为只产生乳酸的同质乳杆菌和产生乳酸以外，

表 2(2) 拟杆菌属菌种的鉴定

菌种	对照		菌形	落态	菌体染色	葡萄糖	乳糖	阿拉伯糖	木糖	鼠李糖	海藻糖	纤维糖	甘露醇	甘露糖	蔗糖	七叶苷水解	明胶液化	硝酸盐还原	吲哚产生	胆汁耐性	GLC	分析结果
	需氧	厌氧																				
可变拟杆菌 <i>B. variabilis</i>	-	+	灰白半透明、小	小	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	S.A. iv,ib,1	
产黑色素拟杆菌非解糖亚种 <i>B. mela. ss. asaccharolyticus</i>	-	+	灰褐或黑色、小	小	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	A.P.,ib,b iv,1,s	
产黑色素拟杆菌中间型亚种 <i>B. mela. ss. intermedius</i>	-	+	黑色、小	小	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	S.A.,ib,iv	
产黑色素拟杆菌产黑色素亚种 <i>B. mela. ss. melaninogenicus</i>	-	+	黑色、小	小	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	S.L P.,iv,ib,b	
两路拟杆菌 <i>B. bivius</i>	-	+	灰白半透明、小	小	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	S.A P.,ib,iv,1	
迪氏拟杆菌 <i>B. disiens</i>	-	+	灰白半透明、小	小	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	S.A ib,iv,1	
普通拟杆菌 <i>B. vulgatus</i>	-	+	灰白半透明、小	小	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	S.A 1.p,ib,iv	
多酸拟杆菌 <i>B. multiacidus</i>	-	+	灰黄半透明、小	小	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	V	+	-	+	S.L,A,f	

+: 指90%以上呈阳性反应的; 90~100%; -: 指90%以上呈阴性反应的; +: 指弱阳性反应; -+: 指10~40%菌株呈阳性反应的; 10~40% " + " 性反应的strain;
 A: 指乙酸 (Acetic acid); P: 指丙酸 (Propionic acid); ib: 指异丁酸 (Iso-butyric acid); iv: 指异戊酸 (Isovaleric acid); B: 指丁酸 (Butyric acid); L: 指乳酸 (Lactic acid); S: 指琥珀酸 (Succinic acid)。

表 3 从阴道排泄物中分离的乳杆菌菌种

乳杆菌菌种	育龄期妇女40例		更年期、经绝期妇女20例	
	阳性数	阳性率%	阳性数	阳性率%
嗜酸乳杆菌	31*	77.5	10*	50
唾液乳杆菌	18	45	9	45
发酵乳杆菌	17**	42.5	2**	10
短乳杆菌	9	22.5	2	10
德氏乳杆菌	7	17.5	4	20
布氏乳杆菌	5	12.5	0	0
链状乳杆菌	4	10	0	0
乳酸乳杆菌	3	7.5	2	10
干酪乳杆菌	1	2.5	2	10

注：经 χ^2 检验 $P < 0.05$ **经 χ^2 检验 $P < 0.01$
其他 $P < 0.05$

表 4 从阴道排泄物中分离的拟杆菌种

拟杆菌菌种	育龄期妇女40例		更年期、经绝期妇女20例	
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
可变拟杆菌	13	32.5	8	40
产黑色素拟杆菌非解糖亚种	10	25	3	15
产黑色素拟杆菌中间型亚种	2	5	1	5
产黑色素拟杆菌产黑色素亚种	3	7.5	0	0
两路拟杆菌	3	7.5	1	5
迪氏拟杆菌	2	5	2	10
普通拟杆菌	6	15	0	0
多酸拟杆菌	1	2.5	0	0

注：经 χ^2 检验两者无显著性差异 ($P > 0.05$)

还产生乙酸和丙酸、乙醇和伴有大量 CO_2 产生的异质乳杆菌。根据VPI手册。产黑色素拟杆菌和可变拟杆菌等主要脂肪酸代谢产物是乙酸。丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、琥珀酸

等。由GLC分析菌代谢产物结果，结合微生物学鉴定和生化性状以决定乳杆菌和拟杆菌菌种。

目前公认的阴道菌群中最重要的 是乳杆菌，其中以兼性乳杆菌最多见，它在维持阴道内自净作用中起重要作用。乳杆菌在白带中检出率各家报告不一。如Mirris等(1967)报告为49.1%^[2]；de Lowvois(1975)报告^[11]为81.8%；Ohm等报告(1976)为75%；大桥报告为53.7%^[5,10]。我们实验结果与de Louvois报告类似，这与我们取标本的量有关，标本量较大，故分离率较高。关于阴道菌群中乳杆菌的菌种。据Spitzbant等报告主要有：嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌、布氏乳杆菌、两歧乳杆菌、莱氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌等，Carlsson等还报告有詹氏乳杆菌等。大桥等报告^[5]还包括唾液乳杆菌、纤维二糖乳杆菌、乳酸乳杆菌等。本实验与上述资料类似。青岛氏^[7]大桥氏还报告^[8,12]，育龄期妇女阴道菌群以乳杆菌为优势菌群，其阴道pH在4.1~4.4之间，可见乳杆菌为主要菌群的个体中其阴道pH低，波动范围小。即使与其它菌共栖(Commensal)pH值也很少有偏移。而更年期、经绝期多数个体无优势菌群。在以棒状杆菌为优势菌群的个体中，阴道pH高。与 α -链球菌共栖时。则阴道pH值向碱性偏移(升高)。这提示乳杆菌在发酵糖类产酸，保持阴道低pH值的环境中起重要作用。本实验进一步证实，阴道菌群中乳杆菌主要菌种是嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌和短乳杆菌，育龄期与更年期、经绝期菌种差异主要是嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌，这提示乳杆菌中维持阴道酸性环境，以及受宿主卵巢功能影响较显著的是嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌。

关于阴道菌群中拟杆菌主要菌种Gorbach(1973)^[3]曾报告(分离率约57%)，有产黑色素拟杆菌、多毛拟杆菌、口腔拟杆菌、普通拟杆菌和脆弱拟杆菌。而Duerden(1980)报告

[13]拟杆菌分离率约61%。主要菌种是非解糖拟杆菌产黑色素拟杆菌、可变拟杆菌。其次是两路拟杆菌和迪氏拟杆菌，还分离到脆弱拟杆菌等。我们的实验结果与Duerden报告类似，我们并比较了育龄期和更年期、经绝期分离拟杆菌菌种的差异，两者之间差异不显著。这提示拟杆菌并非是阴道菌群中的优势菌群。其菌种受宿主卵巢激素影响也不明显。我们的实验还证实非解糖拟杆菌较为多见。

近年关于妇产科感染症的报告[14]，其主要致病菌是大肠杆菌、拟杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌、消化链球菌和白色念珠菌。还指出大肠杆菌与拟杆菌混合感染的个体其病情最重且死亡率高，这与大肠杆菌感染造成有利于拟杆菌等厌氧菌生长的低Eh环境有关。还有报告指出，厌氧菌在妇产科总感染为72%，其中尤以拟杆菌(40%)、消化链球菌(17%)、消化球菌(13%)多见。这些致病菌大多都是内源性的，来源于阴道菌群。因此，产前或术前妇女阴道菌群的常规检查并采取相应的治疗措施，以及分娩前产道的严格消毒措施和术前术中的无菌操作，都是保障妇女、儿童健康的重要措施，不容忽视。

摘 要

本文分析了40名育龄妇女和20名更年期、绝经期妇女的阴道排泄物。育龄期妇女中，每毫升阴道排泄物含有活菌数(以Lg计)：乳杆菌为 7.912 ± 1.856 (总分离率92.5%)，拟杆菌为 5.748 ± 2.98 (77.5%)，表皮葡萄球菌 6.432 ± 2.589 (95%)， α -链球菌为 5.502 ± 1.854 (85%)，大肠杆菌为 4.403 ± 2.372 (95%)，肠球菌为 4.524 ± 1.544 (90%)，白色念珠菌为 3.686 ± 2.294 (85%)。这些妇女的阴道pH 5.158 ± 1.346 。更年期和绝经期妇女的阴道菌群：乳杆菌群 7.143 ± 0.368 (60%)，拟杆菌为 4.941 ± 0.598 (45%)，表皮葡萄球菌为 8.398 ± 1.140 (80%)，大肠杆菌为 4.644 ± 1.684 (75%)，肠球菌为 4.838 ± 1.162 (50%)，白色念珠菌为 4.459 ± 1.130 (70%)，金黄色葡萄球菌为 8.267 ± 1.192 (70%)。更年期及绝经期妇女阴道的pH为 5.955 ± 0.980 。

我们在实验中应用GLC分析细菌的代谢产物，以助拟杆菌和乳杆菌的鉴定和分类。

ABSTRACT

In studying the vaginal flora of normal healthy women living in Nanchang, Jiangxi province, we have analysed 7-9 groups of microbial flora, which were isolated from vaginal discharge of adult women including 40 of child-bearing period and 20 of climacteric and menopausal women. The number of vaginal bacteria found in the vaginal discharge is calculated in term of log number: in those women of generative period, lactobacilli, 7.912 ± 1.856 (frequency of isolation 92.5%); Bacteroides, 5.748 ± 2.980 (77.5%); Sta. epidermidis, 6.432 ± 2.589 (95%); α -hemolytic streptococci, 5.502 ± 1.854 (85%); E. coli, 4.403 ± 2.372 (95%); Enterococci, 4.524 ± 1.544 (90%); Candida albicans, 3.684 ± 2.294 (85%); The mean pH of vaginal discharge was found to be 5.158 ± 1.346 . In those specimen of climacteric and menopausal women there were: Lactobacilli 7.143 ± 0.368 (60%); Bacteroides, 4.914 ± 0.500 (45%); S. epidermidis, 8.398 ± 1.140 (80%); E. coli 4.644 ± 1.684 (75%); Enterococci, 4.838 ± 1.162 (50%); Candida albicans, 4.459 ± 1.130 (70%) Sta. aureus, 8.267 ± 1.192 (70%); The mean pH of vaginal discharge, 5.955 ± 0.980 .

In our studies, we used GLC in analysing bacterial metabolic products. Which is helpful in the identification and classification of Bacteroides genus and Lactobacilli genus.

参 考 文 献

1. Laughton N: J Hygiene, 48: 346, 1950
2. Morris CA et al: J Clin Path, 20: 636, 1967
3. Gorbach SL et al: Am J Obstet Gynecol, 117: 1053-1973
4. Corbishley CM: J Clin Path, 39: 745, 1980
5. 大桥浩文: 感染症学杂志, 54(7): 321, 1980
6. Pratt JH et al: Am J Obstet Gynecol, 93: 812, 1965
7. 青岛茂树他: 日泌尿会志, 68: 33, 1977
8. 大桥浩文他: 感染症学杂志, 55(5): 373, 1981
9. Buchanan RE et al: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Baltimore, p 581, 8th ed, 1974
10. 户田忠雄: 户田新细菌学, 第27版, 东京, 南山堂P 424, 1979
11. de Louvois J et al: J Clin Pathol, 28: 731, 1975
12. 大桥浩文: 感染症学杂志, 55(3): 171, 1981
13. Duerden BI: J Med Microbiol, 1: 77, 1980
14. 大桥浩文: 感染症学杂志, 56(8): 647, 1982
15. Fagnant JE et al: J Clinical Microbiol, 16(5): 924, 1982