

DOI:10.13350/j.cjpb.220223

• 临床研究 •

鼻咽癌患者鼻咽部菌群分布及耐药性分析*

胡伟群^{1,2}, 陈秀芬^{1**}, 黄金樵¹, 茅林蔚¹, 潘志勇¹, 蒋远伟¹

(1. 莆田学院附属医院, 福建莆田 351100; 2. 福建医科大学)

【摘要】 目的 探究鼻咽癌患者鼻咽部菌群分布, 对于鼻咽癌患者临床治疗进程具有积极推进作用。方法 收集鼻咽部分泌物样本, 采用全自动微生物鉴定仪鉴定菌株, 采用琼脂稀释法分析表皮葡萄球菌和草绿色链球菌的耐药期刊。PCR扩增、基因测序分析耐药基因变异情况。结果 2014-2019年鼻咽癌患者鼻咽部分离菌株112株, 各年分离菌株数分别为8、13、11、16、18和46株, 分别占7.14%、11.61%、9.82%、14.29%、16.07%和41.07%; 其中表皮葡萄球菌39株, 草绿色链球菌17株, 为优势菌种。表皮葡萄球菌对头孢拉定、罗氏芬、氧哌嗪、西力欣、复达欣、环丙沙星的耐药率分别为5.13%、10.26%、17.95%、20.51%、23.08%和33.33%; 草绿色链球菌的耐药率分别为5.88%、5.88%、17.65%、17.65%、23.53%和35.29%。检表皮葡萄球菌和草绿色链球菌环丙沙星耐药菌株中 *gyrA* 基因变异率为100%。表皮葡萄球菌中 *gyrA* 基因变异位点包括107位碱基(C→G)、251位碱基(C→T)、336位碱基(C缺失), 变异率分别为53.85%(7/13)、38.46%(5/13)、7.69%(1/13); 草绿色链球菌中, *gyrA* 基因变异位点包括243(C→G)、260(G→T)变异率分别为66.67%(4/6)、33.33%(2/6)。结论 鼻咽癌患者鼻咽部菌群中以表皮葡萄球菌和草绿色链球菌为优势菌种。临床治疗中应优先选用头孢拉定, 但仍应合理使用。表皮葡萄球菌和草绿色链球菌对环丙沙星的耐药性来自于 *gyrA* 基因变异, 应减少该类药物使用。

【关键词】 鼻咽癌; 菌群分布; 耐药性; *gyrA* 基因

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)02-0233-03

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Feb;17(2):233-235,239.]

Investigation on the bacteria distribution of nasopharyngeal site in patients with nasopharyngeal carcinoma

HU Wei-qun^{1,2}, CHEN Xiu-fen¹, HUANG Jin-qiao¹, MAO Lin-wei¹, PAN Zhi-yong¹, JIANG Yong-wei¹ (1. Affiliated Hospital of Putian College, Putian 351100, Fujian, China; 2. Fujian Medical University)***

【Abstract】 **Objective** Bacteria distribution of nasopharyngeal site in patients with nasopharyngeal carcinoma were investigated, which plays a positive role in promoting the clinical treatment of patients with nasopharyngeal carcinoma.

Methods Samples of nasopharyngeal secretions were collected and the distribution of bacteria was analyzed by automatic microbiological identification instrument. Agar dilution method was used to analyze the drug resistance of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus viridans*. Mutation of drug resistance genes was analyzed by PCR amplification and gene sequencing.

Results From 2014 to 2019, 112 strains were isolated from nasopharyngeal carcinoma patients. The number of strains isolated in each year were 8, 13, 11, 16, 18 and 46, accounting for 7.14%, 11.61%, 9.82%, 14.29%, 16.07% and 41.07% respectively. Among them, 39 strains of *S. epidermidis* and 17 strains of *S. viridans* were the dominant strains. The drug resistance rates of *S. epidermidis* to cefradine, roche, piperazine, cilixin, fudachin and ciprofloxacin were 5.13%, 10.26%, 17.95%, 20.51%, 23.08% and 33.33%, respectively. The drug resistance rates of *S. viridans* were 5.88%, 5.88%, 17.65%, 17.65%, 23.53% and 35.29%, respectively. The mutation rate of *gyrA* gene in ciprofloxacin resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus viridis* was 100%. In *S. epidermidis*, the *gyrA* gene mutation sites included 107 bases (C→G), 251 bases (C→T), and 336 bases (C deletion), with the mutation rates of 53.85%, 38.46%, and 7.69%, respectively. In *S. viridans*, the *gyrA* gene mutation sites, including 243(C→G) and 260(G→T), the mutation rate were 66.67% and 33.33%, respectively. **Conclusion** *S. epidermidis* and *S. viridans* were dominant bacteria in the nasopharyngeal flora of patients with nasopharyngeal cancer. Cefradine should be chosen as the first choice in clinical treatment, but it should still be used reasonably. Resistance to ciprofloxacin in *S. epidermidis* and *S. viridans* due to a *gyrA* gene mutation and the use of ciprofloxacin should be reduced.

* **【基金项目】** 莆田市科技计划项目(No. 2019S3F008)。

** **【通讯作者】** 陈秀芬, E-mail: 1831414065@qq.com

【作者简介】 胡伟群(1967-), 男, 福建莆田人, 医学学士, 主任医师, 研究方向: 头颈肿瘤研究。E-mail: pjzhkd168134@163.com

【Key words】 nasopharyngeal carcinoma; bacteria distribution; drug resistance; gyrA gene

人体菌群分布情况与机体健康关系密切,有报道称,人体菌群分布及变化会影响肿瘤疾病的发生发展,但具体作用机制尚未阐明。人体本身存在的正常菌群,在机体免疫能力降低时也可能发展成为条件致病菌^[1]。患者发生感染后,病原菌可以破坏宿主的免疫系统,引发慢性炎症刺激,甚至损伤细胞 DNA。有些菌群所产生的毒素类物质,可以通过破坏信号转导通路,影响人体正常细胞调控路径,从而影响肿瘤的发生、发展进程^[2]。另外,菌群还可以通过影响肿瘤相关基因的甲基化,进而影响肿瘤发病进程。鼻咽癌发病患者机体免疫水平较差,鼻咽部黏膜薄弱,容易发生反复感染、溃疡病变、甚至坏死,坏死组织脱落易会导致鼻咽部出血,鼻咽部出血严重者,在短时间内出血量可超过机体的 30%-35%,甚至更多,危及生命安全^[3]。因此,积极探究鼻咽癌患者菌群分布,避免感染发生,对疾病进程控制有重要意义。

材料与方 法

1 菌群鉴定

依据《全国临床检验操作规程》采集患者鼻咽部分泌物样本,将细菌培养在巧克力平板、麦康凯平板、血琼脂平板,37℃培养 48 h。采用全自动细菌鉴定仪,配备专用的革兰阴性菌卡(GPI)、革兰阳性菌鉴定卡(GNI+),对鼻咽癌患者鼻咽部菌群分布情况进行鉴定。

2 主要试剂与仪器

VITEK-2 全自动细菌分析系统购买于法国生物梅里埃公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶购买于德国 Qiagen 公司;DNA Marker 购买于日本 Takara 公司;PCR 产物回收试剂盒,北京 Trans-Gen 生物公司;PCR 扩增仪、凝胶成像仪购买于 Bio-Rad 公司;低温冰箱,中国青島 Hair 公司。

3 耐药性分析

采用琼脂稀释法检测表皮葡萄球菌、草绿色链球菌对抗菌药物的最小抑菌浓度。根据 CLSI2017 要求,将抗菌药物溶解并稀释成不同浓度,即 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/L。使用无菌生理盐水将菌悬液稀释至 10⁷ CFU/ml。吸取 1~2 μl 菌液接种到含有不同浓度抗生素的琼脂板上,同时设有阴性对照。依据 CLSI 2017 读取耐药性结果。

4 耐药基因检测

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取表皮葡萄球菌、草绿色链球菌基因组 DNA,-20℃保存待用。gyrA 基因 PCR 扩增引物:上游引物:CGCCG-

TATTTTGTATGGGATG;下游引物:GTTCCGT-TAACCAGAAGGTT;产物长度 377 bp;扩增反应体系:DNA 模板 2 μl、Taq 聚合酶 1 μl、上下游引物各 1 μl、dNTPs 1 μl、PCR Mix 2.5 μl,用水补足至 25 μl。扩增条件:预变性 94℃ 2 min,变性 94℃ 30 s,退火 56℃ 30 s,延伸 72℃ 45 s,30 个循环后,72℃ 终延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪拍照记录结果。

5 基因测序

纯化基因扩增产物,送至上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序,并使用 BLASTn 软件比对基因库中 gyrA 基因的原始序列,分析基因变异情况。

结 果

1 鼻咽癌患者鼻咽部菌群分布

2014-2019 年鼻咽癌患者鼻咽部分离菌株 112 株,具体见表 1。鼻咽癌患者鼻咽部菌群数逐年增加,各年分离菌株数分别为 8、13、11、16、18 和 46 株,分别占 7.14%、11.61%、9.82%、14.29%、16.07% 和 41.07%;其中表皮葡萄球菌 39 株,草绿色链球菌 17 株,为鼻咽癌患者鼻咽部菌群中的优势菌种。

表 1 鼻咽癌患者鼻咽部菌群分布情况
Table 1 Bacteria distribution of nasopharyngeal site in patients with nasopharyngeal carcinoma

细菌 Bacteria	分离株数 Isolated strains						合计 Total
	2014 年	2015 年	2016 年	2017 年	2018 年	2019 年	
表皮葡萄球菌	1	2	4	6	11	15	39
草绿色链球菌	1	2	2	3	1	8	17
肺炎克雷伯菌	0	1	1	2	2	7	13
金黄色葡萄球菌	2	2	0	1	1	6	12
大肠埃希菌	1	1	2	1	0	4	9
革兰阳性杆菌	1	1	0	1	1	3	7
产气大肠杆菌	1	1	0	1	0	2	5
其他	1	3	2	1	2	1	10
合计 Total	8	13	11	16	18	46	112

2 鼻咽癌患者鼻咽部优势菌种耐药性

39 株表皮葡萄球菌对头孢拉定、罗氏芬、氧哌嗪、西力欣、复达欣、环丙沙星的耐药菌株分别为 2、4、7、8、9 和 13 株,耐药率分别为 5.13%、10.26%、17.95%、20.51%、23.08% 和 33.33%;17 株草绿色链球菌耐药菌株分别为 1、1、3、3、4 和 6 株,耐药率分别为 5.88%、5.88%、17.65%、17.65%、23.53% 和 35.29%。鼻咽癌患者鼻咽部优势菌种对临床常用药物产生了一定程度耐药性,其中对头孢拉定最敏感、罗氏芬次之;对环丙沙星耐药性最高。

3 鼻咽癌患者鼻咽部优势菌种耐药基因检测

对环丙沙星耐药的13株表皮葡萄球菌和6株草绿色链球菌菌株中gyrA基因变异情况进行检测,基因变异率为100%,gyrA基因变异的表皮葡萄球菌和草绿色链球菌对环丙沙星均耐药。表皮葡萄球菌中,gyrA基因变异位点包括107位碱基(C→G)、251位碱基(C→T)、336位碱基(C缺失),变异率分别为53.85%(7/13)、38.46%(5/13)、7.69%(1/13);草绿色链球菌中,gyrA基因变异位点包括243(C→G)、260(G→T)变异率分别为66.67%(4/6)、33.33%(2/6)。

讨 论

鼻咽癌是指鼻咽腔顶部和侧壁发生的恶性肿瘤疾病,是我国恶性肿瘤高发类型之一。鼻咽癌的发病率是耳鼻咽喉恶性肿瘤疾病之首,发病患者机体免疫力差,加之,患者鼻咽部黏膜薄弱,容易反复感染、出现溃疡病变,甚至坏死。放射治疗是鼻咽癌患者临床治疗中最常用的治疗手段之一。长期的放疗操作,在杀伤癌细胞的同时,对正常组织也会有杀伤作用^[4]。特别是鼻咽部和口腔粘膜,是鼻咽癌患者发病病灶附近组织,在接受大剂量放疗后,会出现细胞肿胀、坏死,血管通透性增大,以及微细血管闭塞、红斑、溃疡、咽痛等情况^[5]。鼻咽部是开放性器官,通常情况下,其表面会定植一些非致病菌,并且具有一定的抗病原菌侵袭能力,与致病菌存在克制作用,而形成一定的菌群分布环境^[6]。但是,对于接受放疗的鼻咽癌患者,鼻咽部菌群生态结构变化,局部肿胀等会更利于病原菌侵袭、生长和定植,此时患者体内的正常菌群也可能转变为条件致病菌,最终导致合并感染发生,严重危及患者健康及生命安全^[7]。因此,积极探究鼻咽癌患者鼻咽部菌群变化,预防感染发生,积极探究细菌耐药情况,指导预防用药,对于鼻咽癌患者临床治疗进程具有积极推进作用。

本研究发现,患者鼻咽部定植的菌群中以表皮葡萄球菌和草绿色链球菌为主,2014-2019年间,从鼻咽癌患者中分离的细菌丰度逐年增加,应给予高度重视。进一步对鼻咽癌患者鼻咽部中优势菌种进行耐药性分析发现,表皮葡萄球菌和草绿色链球菌对头孢拉定相对最敏感,罗氏芬次之。因此,在临床治疗中可以优先选用头孢拉定,罗氏芬次之,但仍应合理用药,避免耐药问题加剧以及耐药菌株流行传播。然而,鼻咽癌患者鼻咽部优势菌种对环丙沙星耐药性较高。这可能与环丙沙星在临床治疗中的使用频度较高有关^[8]。环丙沙星是第三代喹诺酮类抗菌药物,该药对肠杆菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、绿脓杆菌、链球菌等均具有较好的具有抗菌作用^[9]。但随着临床治疗中的使用频率越来越高,如越来越多地用于呼吸道感染、泌尿道

感染、妇科疾病感染等疾病治疗中,导致临床病原菌对该药产生了耐药性。

本研究针对鼻咽癌患者鼻咽部优势菌种对环丙沙星的高耐药性发生机制进行进一步探究。已知环丙沙星属于喹诺酮类抗菌药物,此类药物以细菌DNA作为靶点,通过妨碍DNA回旋酶作用使DNA发生不可逆损伤来实现抗菌作用^[10]。具体地说,喹诺酮类抗菌药物是通过抑制细菌体内的II型拓扑异构酶活性来发挥抑菌作用的。II型拓扑异构酶是细菌生长的必须酶,它可以使新复制的DNA链解离,改变DNA超螺旋状态,来参与DNA复制、转录等重要过程^[11]。II型拓扑异构酶中的旋转酶是由gyrA基因和gyrB基因编码的蛋白质构成的四聚体,有研究报道^[12-13],革兰阳性菌的gyrA基因突变与其对喹诺酮类抗菌药物耐药密切相关。因此,本研究深入检测了表皮葡萄球菌和草绿色链球菌环丙沙星耐药菌株中gyrA基因序列,结果表明,表皮葡萄球菌和草绿色链球菌环丙沙星耐药菌株gyrA基因序列100%变异,表明gyrA基因变异与细菌对环丙沙星的高耐药性密切相关。

对于表皮葡萄球菌耐药株,由于107位胞嘧啶(C)突变为鸟嘌呤(G)导致脯氨酸(Pro)突变为丙氨酸(Ala),251位胞嘧啶(C)突变为胸腺嘧啶(T)导致丝氨酸(Ser)突变为苯丙氨酸(Phe),336位胞嘧啶缺失导致氨基酸错位突变,从而使表皮葡萄球菌对环丙沙星产生高耐药性;对于草绿色链球菌耐药株,由于243位胞嘧啶(C)突变为鸟嘌呤(G)导致丝氨酸(Ser)突变为精氨酸(Arg),260位鸟嘌呤(G)突变为胸腺嘧啶(T)导致精氨酸(Arg)突变为亮氨酸(Leu),从而使草绿色链球菌对环丙沙星产生高耐药性;因此,gyrA基因变异可能是导致表皮葡萄球菌和草绿色链球菌对环丙沙星产生高耐药性的直接原因^[14]。临床应积极监测gyrA基因序列变异情况,合理使用环丙沙星进行临床抗感染治疗,减少耐药株流行传播及,控制耐药性发展。

【参考文献】

- [1] 张宁,卫光宇,谭以昶,等. 鼻咽癌患者鼻咽和口咽的细菌培养及药物敏感性分析[J]. 广东医学院学报,2005,23(4):458-460.
- [2] 张勇,黄婷婷,陈静珊,等. 鼻咽癌患者在放疗过程中鼻咽部细菌群落结构的动态变化[J]. 广西医科大学学报,2017,34(3):359-363.
- [3] Lax A. The Pasteurella multocida toxin: A new paradigm for the link between bacterial infection and cancer[J]. Curr Top Microbiol Immunol,2012(361):131-144.
- [4] Bebek G, Bennett K, Funchain P, et al. Microbiomic sub profiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Hum Mol Genet,2012,21(7):1557-1565.

- [7] 米善军. 多维视角:云南省疟疾研究综述[J]. 保山学院学报, 2018, 37(04):10-19.
- [8] 李曼,周红宁. 云南登革病毒研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(9):4.
- [9] 田杰. 云南省瑞丽市不明原因发热病例七种蚊媒病毒分子流行病学调查[D]. 昆明医科大学, 2021.
- [10] Yin XX, Hu TS, Zhang HL, et al. Emergent chikungunya fever and vertical transmission in Yunnan Province, China, 2019[J]. Arch Virol, 2021;166(5):1455-1462.
- [11] 李华宪,陈国伟,杨沅川,等. 云南省 2001-2010 年疟疾流行现状与趋势[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013(2):5.
- [12] 朱秋艳. 云南省流行性乙型脑炎发病危险因素及防控现状调查[D]. 昆明医科大学, 2017.
- [13] Kuwata R, Nga PT, Yen NT, et al. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008[J]. Am J Trop Med Hyg, 2013, 88(4):681-688.
- [14] Manh CD, Beebe NW, Van VN, et al. Vectors and malaria transmission in deforested, rural communities in north-central Vietnam[J]. Malar J, 2010, 9 (1):259.
- [15] Sun X, Fu S, Gong Z, et al. Distribution of arboviruses and mosquitoes in northwestern Yunnan Province, China[J]. Vector-Borne Zoonotic Dis, 2009, 9(6):623.
- [16] Wang J, Zhang H, Sun X, et al. Distribution of mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in Yunnan Province near the China-Myanmar-Laos border[J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 84(5):738-746.
- [17] 王剑,郭晓芳,鲍建忠,等. 云南楚雄 2014 年蚊媒及其病毒感染调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(6):8.
- [18] 陈俊利,孙肖红,张琼华,等. 云南河口-越南老街口岸地区蚊媒调查[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2015(2):4.
- [19] 高玉峰,程晓兰,丁晔,等. 中国西南边境地区蚊类携带病原体调查[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2020, 43(2):4.
- [20] 曹晓梅,方志强,李颖,等. “一带一路”广西云南重点口岸蚊类监测分析[J]. 中华卫生杀虫药械, 2021, 27(01):21-25.
- [21] Zhai YG, Wang HY, Sun XH, et al. Complete sequence characterization of isolates of Getah virus (genus Alphavirus, family Togaviridae) from China[J]. J Gen Virol, 2008, 89(6):1446-1456.
- [22] 张海林,陶三菊,杨冬荣,等. 云南首次分离到辛德毕斯(Sindbis), 巴泰(Batai)和 Coiti 病毒[J]. 中国人兽共患病学报, 2005, 21(7):548-551, 557.
- [23] 陶三菊,张海林,杨冬荣,等. 云南省澜沧江下游地区虫媒病毒的调查研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003(04):24-28, 2.
- [24] 冯云,何彪,付士红,等. 云南蚊虫中阿卡斑病毒的分离和鉴定[J]. 病毒学报, 2015, 31(1):7.
- [25] 周涛,张海林,李铭华,等. 云南省文山中越边境地区虫媒病毒调查[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(12):5.

【收稿日期】 2021-10-13 【修回日期】 2021-12-22

(上接 235 页)

- [5] Xu Y, Teng F, Huang S, et al. Changes of saliva microbiota in nasopharyngeal carcinoma patients under chemo radiation therapy [J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(2):176-186.
- [6] 刘坤,王冀川,王捷,等. 鼻咽癌放疗后咽部菌群的变化[J]. 肿瘤预防与治疗, 2008, 21(4):415-417.
- [7] 陈幼华,罗晋卿,陶健萍,等. 鼻咽癌患者放疗期间口咽细菌动态变化及耐药性分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(50):1613-1616.
- [8] Aguiar GP, Jham BC, Magalhaes, et al. A review of the biological and clinical aspects of radiation caries [J]. Contemp Dent Pract, 2009, 10(4):83-89.
- [9] Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy[J]. Support Care Cancer, 2010, 18(8):985-992.
- [10] 陈奕霞,彭颂国,田丽贞,等. 鼻咽癌患者肿瘤周围分泌物细菌培养及耐药性分析[J]. 国际检验医学志, 2014(1):100-101.
- [11] Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer human papilloma virus infection and surgical treatment[J]. Oncotarget, 2016, 7(32):51320-51334.
- [12] Shao ZY, Tang SZ, Yan C, et al. Effects of intensity-modulated radiotherapy on human oral microflora[J]. J Radiat Res, 2011, 52(6):834-839.
- [13] 江青山,肖建华,刘安元,等. 16S rDNA 技术在鼻咽癌患者和正常人咽部细菌组成中的比较研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009(2):86-90, 96.
- [14] 于湛,邓晓琴,邹杨,等. 鼻咽癌患者鼻咽冲洗液菌群检测及结果分析[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(2):137-140.

【收稿日期】 2021-12-08 【修回日期】 2022-02-12