

双 J 管生物被膜菌相关感染特点及耐药性分析

董 妍(南京市江北人民医院检验科 210048)

【摘要】 目的 筛选双 J 管置留患者的双 J 管感染生物被膜菌,了解其临床分布与耐药性,探讨生物被膜菌在模拟体内条件下对抗菌药物的耐药性。**方法** 收集 150 例双 J 管相关尿路感染患者的双 J 管及尿液,筛选生物被膜菌,增殖培养。并对生物被膜阳性菌在普通水解酪蛋白(MH)培养基与泊洛沙姆(Poloxamer)培养基上的耐药性差异进行分析。**结果** 150 例双 J 管置留患者双 J 管中筛选出生物被膜菌 42 株,阳性率 28%。生物被膜菌在 Poloxamer 培养基和 MH 培养基上药敏结果差异有统计学意义($P < 0.05$),且前者耐药性更强。**结论** 该院双 J 管感染的生物被膜菌在临床上以葡萄球菌属和肠球菌属为主,生物被膜菌在 MH 培养基上耐药性与在 Poloxamer 培养基上耐药性有明显差异,Poloxamer 培养基可以较真实的表现生物被膜菌药物耐受情况,其耐受性更强。

【关键词】 尿路感染; 双 J 管; 生物被膜; 耐药性
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.07.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)07-0783-03

Characteristic of biofilm-associated infections in double J tube and their drug resistance analysis DONG Yan (Department of Laboratory, Jiangbei District People's Hospital, Nanjing, Jiangsu 210048, China)

【Abstract】 Objective To screen biofilm bacteria in the patients with indwelling double J tube to understand their clinical distribution and drug resistance, and to investigate their resistance to antibiotics under simulating in vivo conditions. **Methods** Double J tube and urine were collected from 150 patients with double J tube associated urinary infections for screening biofilm bacteria and proliferation culture. The difference of drug resistance of positive strains of biofilm on Poloxamer medium and common MH medium was analyzed. **Results** Totally 42 strains of biofilm bacteria were screened out from double J tube in 150 cases of indwelling double J tube, showing the positive rate of 28%. The results difference of the drug sensitivity test of biofilm bacteria in Poloxamer medium and MH medium was statistically different ($P < 0.05$), and the former was stronger. **Conclusion** Biofilm bacteria infection in double J tube are mainly Staphylococci and Enterococci. The antibiotic resistance of biofilm in MH medium and Poloxamer medium is different. Poloxamer medium may display the true drug resistance of biofilm bacteria and has stronger tolerance.

【Key words】 urinary tract infections; double J tube; biofilms; drug resistance

细菌生物被膜(bacterial biofilm)是细菌为了适应自然环境形成的一种生长方式,是由细菌自身分泌的胞外多黏蛋白复合物将自身克隆、聚集、包裹于其中所形成的膜样物。它能表达和浮游菌耐药特点不同的新耐药表型^[1]。生物被膜菌引发的感染已逐渐成为主要的医院感染,并且后果日趋严重^[2]。细菌生物被膜常在置入医疗器材以及泌尿道中形成,当其侵入到膀胱上皮组织细胞之后,少部分休眠于细菌停留在此,引起反复性的顽固感染^[3]。为进一步了解生物被膜菌的耐药性,现对双 J 管置留患者分离的生物被膜菌分别进行 MH 培养基和泊洛沙姆(Poloxamer)培养基^[4]的耐药性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 10 月至 2011 年 3 月本院留置双 J 管后发生尿路感染的患者 150 例,年龄 16~75 岁,平均 38.7 岁,留置双 J 管时间 5 d 至 6 个月,平均 2.8 个月。留置原因:输尿管结石取石术 61 例,肾盂输尿管连接部梗阻成形术 26 例,输尿管狭窄术 24 例,肾盂切开取石术 18 例,肾结核 11 例,输尿管损伤 7 例,肾积水 3 例。插管后尿路感染的诊断标准为:(1)患者发热高于 37.5℃;(2)尿中白细胞数大于 5/高倍视野;(3)中段尿培养细菌数大于 10⁵/mL,有明显尿频、排尿不适等尿路刺激症状者^[5]。

1.2 标本采集 一次性尿袋引流管上端消毒后,用一次性注射器抽取尿液 3 mL 置于无菌接种瓶中。患者拔管后,将双 J 管分为 3 段(肾盂段、膀胱段、输尿管段),每段约 3 cm,置于无

菌接种瓶中。反复用肉汤冲洗双 J 管,将管内的膜状物洗脱并使之增殖培养。

1.3 筛选生物被膜菌 将收集的尿液和冲洗双 J 管并增殖培养后的肉汤分别接种于刚果红平板上,37℃恒温孵育箱中培养 48 h 后观察结果。刚果红染液与细菌表面的多糖和黏膜反应,从而着色,使菌落变为黑色,并且出现干燥结晶,则此菌落为生物被膜菌落^[6],菌落红色不变者为浮游菌落^[7]。将黑色的生物被膜菌接种于血平板上,用 VITEK COMPACT2 全自动微生物鉴定仪鉴定细菌到种。并将生物被膜菌收集于无菌牛奶中,-70℃冻存以备进行药敏试验。

1.4 药敏试验 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐的纸片扩散法,对生物被膜菌进行药敏试验。具体方法如下:(1)对于革兰阳性球菌用替考拉宁、米诺环素、利福平、头孢西丁、红霉素、庆大霉素(10 μg)、万古霉素、庆大霉素(120 μg)、利奈唑啉、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、复方新诺明、亚胺培南、苯唑西林在 MH 培养基上进行药物敏感性检测。(2)对于革兰阴性杆菌用头孢他啶、头孢吡肟、左氧氟沙星、复方新诺明、亚胺培南、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、氨基糖苷类、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素(10 μg)、头孢唑啉、头孢噻肟、呋喃妥因、阿米卡星在 MH 培养基上进行药物敏感性检测。在 MH 的肉汤中加入 30%的 Poloxamer,将配置成的培养液经高温消毒后放置于 4℃的冰箱中,使 Poloxamer 完全溶解。待用时将其倒入平板并放于 37℃的温箱中过夜,使其完全凝固。将上述在

MH 培养基上进行药敏试验的生物被膜菌相对应的涂布于 Poloxamer 培养基上进行药物敏感性检测。所用的抗菌药物与 MH 培养基上的相同,以便进行分析比较。

1.5 统计学处理 使用 SPSS13.0 软件, χ^2 检验确切概率法对上述结果进行统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物被膜菌菌株分布以及构成比 150 例尿路感染患者双 J 管中,筛选出生物被膜阳性菌 42 株,阳性率为 28%。经细菌菌属鉴定,以革兰阳性球菌为主,32 株(76.1%),其中葡萄球菌属占 40.4%、肠球菌属占 35.7%。葡萄球菌属中以血浆凝固酶阴性菌为主,如:表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌以及人型葡萄球菌。革兰阴性杆菌仅 10 株(23.9%),包括铜绿假单胞菌、大肠埃希菌以及鲍曼不动杆菌。见表 1。

表 1 双 J 管内生物被膜菌的菌株分布

菌属	菌名	菌数	构成比(%)
肠球菌	粪肠球菌	12	28.6
	尿肠球菌	3	7.1
葡萄球菌	表皮葡萄球菌	8	19.0
	溶血葡萄球菌	5	11.9
	人型葡萄球菌	3	7.1
	金黄色葡萄球菌	1	2.4
假单胞菌	铜绿假单胞菌	4	9.5
肠杆菌	大肠埃希菌	5	11.9
不动杆菌	鲍曼不动杆菌	1	2.4

2.2 MH 培养基与 Poloxamer 培养基耐药性比较 生物被膜菌分别在 MH 普通培养基与在 Poloxamer 培养基上的药敏结果显示,生物被膜菌在两种培养基上的耐药性大部分差异有统计学意义($P<0.05$)。在 Poloxamer 培养基上表现出比普通 MH 培养基上更强的耐药性。由此可以推测,Poloxamer 培养基有可能表现出生物被膜菌在人体内更为真实的对于抗菌药物的耐受情况。其耐受性比在体外普通 MH 培养基药敏试验的耐受性更强。见表 2、3。

表 2 革兰阳性生物被膜菌在普通 MH 培养基与 Poloxamer 培养基的药敏结果比较($n=32$)

抗菌药物	生物被膜菌在 MH 上耐药率 [$n(\%)$]	生物被膜菌在 Poloxamer 上 耐药率[$n(\%)$]	P
替考拉宁	4(12.5)	31(96.9)	0.000
米诺环素	21(65.6)	30(93.8)	0.005
利福平	26(81.3)	32(100.0)	0.012
头孢西丁	28(87.5)	30(93.8)	0.336
红霉素	22(68.8)	29(90.6)	0.030
庆大霉素(10 μg)	25(78.1)	29(90.6)	0.151
庆大霉素(120 μg)	15(46.9)	30(93.8)	0.000
万古霉素	14(43.8)	28(87.5)	0.000
利奈唑烷	0(0.0)	22(68.8)	0.000
氨苄西林/舒巴坦	4(12.5)	13(40.6)	0.011
环丙沙星	10(31.3)	24(75.0)	0.000
复方新诺明	27(84.4)	30(93.8)	0.213
亚胺培南	0(0.0)	5(15.6)	0.026
苯唑西林	25(78.1)	31(96.9)	0.027

表 3 革兰阴性生物被膜菌在普通 MH 培养基与 Poloxamer 培养基的药敏结果比较($n=10$)

抗菌药物	生物被膜菌在 上耐药 [$n(\%)$]	生物被膜菌在 Poloxamer 上 耐药率[$n(\%)$]	P
庆大霉素 10 μg	8(80.0)	9(90.0)	0.500
氨苄西林/舒巴坦	0(0.0)	4(40.0)	0.042
环丙沙星	2(20.0)	7(70.0)	0.035
复方新诺明	8(80.0)	9(90.0)	0.500
亚胺培南	0(0.0)	2(20.0)	0.237
头孢他啶	4(40.0)	9(90.0)	0.029
头孢吡肟	6(60.0)	10(100.0)	0.043
左氧氟沙星	6(60.0)	10(100.0)	0.043
氨基曲南	6(60.0)	10(100.0)	0.043
哌拉西林/他唑巴坦	1(10.0)	8(80.0)	0.003
头孢唑啉	4(40.0)	9(90.0)	0.029
头孢噻肟	6(60.0)	10(100.0)	0.043
呋喃妥因	2(20.0)	7(70.0)	0.035
阿米卡星	9(90.0)	9(90.0)	0.763

通过表 2、3 结果分析显示,生物被膜菌在普通 MH 培养基和 Poloxamer 培养基上,除头孢西丁、庆大霉素(10 μg)、复方新诺明、阿米卡星、亚胺培南的耐药率在两组中的差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余药物的耐药率在两种培养基上的差异均有统计学意义($P<0.05$)。分析上述 5 种耐药率差异无统计学意义的药物耐药率可知:头孢西丁、庆大霉素(10 μg)、复方新诺明、阿米卡星在两种培养基上耐药率均较高;亚胺培南在两种培养基上敏感性均较高。因此该种药物在两种培养基上差异不大,并不影响对两种培养基上抗菌药物耐药性的整体情况分析。所以,通过以上数据结果的分析可知,生物被膜菌在普通 MH 培养基和 Poloxamer 培养基上的耐药率差异有统计学意义($P<0.05$),且生物被膜菌在 Poloxamer 培养基上的耐药性更强。

3 讨 论

双 J 管又称双猪尾管,因其两端卷曲,每端形似猪尾而得名。由于其支架和内引流作用,能解除输尿管炎性反应、水肿等造成的暂时性梗阻,防止术后伤口漏尿和输尿管狭窄^[8]。因此,其广泛地应用于泌尿外科手术中,适用于肾结石、输尿管结石、肾积水、肾移植、肾及输尿管良性肿瘤等上尿路手术以及碎石机碎石、输尿管狭窄的扩张等治疗过程中^[9]。但是,随着双 J 管放置时间的延长,患者常出现腰腹疼痛、尿频、尿急、尿痛、血尿等。究其原因,上述这些症状都是由于体内置留的双 J 管内逐渐包被形成的生物被膜菌所造成的。

细菌生物被膜是细菌为适应自然环境,在其生长过程中黏附于固体物质表面,进而形成的特殊存在形式,是由多细菌组成的膜状结构。1676 年,Antonie van Leeuwenhoek 从牙菌斑中观察到了细菌生物被膜,1978 年,Costerton 等提出了生物被膜的相关理论。细菌生物被膜广泛地存在于自然环境中。临床上,细菌生物被膜可形成于各种生物置入材料表面,以及体内的黏膜表面,具有极强的耐药性以及免疫逃避性,是造成临床慢性感染的主要原因^[10-13]。细菌生物被膜的形成是一个包括细胞黏附,微菌落生成,分化成熟的动态过程。细胞黏附主要通过细菌表面的黏附素蛋白识别宿主表面受体的过程来完成的。当细菌黏附于固体表面后,细菌产生的胞外多糖对生物被膜的形成以及稳定其三维结构起着至关重要的作用。在细菌生长繁殖的同时,细菌会分泌大量的胞外多糖,黏附单个细

胞进而形成微生物菌落。胞外多糖的量会随着生物被膜的成熟而增加。当表面固有细菌包裹在其自身分泌的多糖基质中,形成高度有组织的结构时,即为生物被膜的成熟期。成熟期的生物被膜内部,在各微菌落之间有相通的输水通道。各微菌落通过输水通道可以进行养料和代谢产物的运输。生物被膜在结构上存在的不均一性以及环境中营养物质代谢产物,信号分子等物质由表及里形成浓度梯度,进而呈现不均一性。这一特性与生物被膜的耐药特性密切相关。

留置的双 J 管表面形成细菌生物被膜是患者出现腰腹疼痛、尿频、尿急、尿痛、血尿等的主要原因。双 J 管表面由于没有机体组织的正常保护机制而使细菌更易于定植其上。定植于双 J 管上的细菌通过分泌多糖、纤维蛋白、脂多糖等多糖复合物,形成微菌落,进一步分化成熟而形成生物被膜存在于双 J 管表面。由于生物被膜在结构上的不均一性以及环境营养物质、信号分子等存在的浓度梯度,使在与生物被膜感染相关疾病的病灶中,抗菌药物仅能有效地杀灭浮游生长的细菌以及生物被膜表面的细菌。然而无法彻底杀灭生物被膜内的细菌。这便造成了生物被膜相关的感染患者疾病的迁延不愈。

本研究从 150 例尿路感染患者的双 J 管中分离得到 42 株生物被膜阳性菌株。通过细菌菌属的鉴定发现,以凝固酶阴性的革兰阳性球菌为主,说明在本院中,留置双 J 管相关的尿路感染患者中,条件致病的革兰阳性球菌更易产生生物被膜菌。在临床上,根据本研究所了解的生物被膜菌的临床分布情况,可以指导临床医生有针对性地调整对此类感染疾病的治疗方案,并且可以进一步达到预防的目的。

通过普通 MH 培养基与 Poloxamer 培养基药敏试验的差异性对比,可以得到以下的结论:生物被膜菌在 MH 培养基与 Poloxamer 培养基上所进行的药物敏感性试验,分析其数据结果可发现,二者差异有统计学意义,后者所表现出的耐药性明显强于前者。由此可见,生物被膜菌在人体内的耐药性完全不同于体外,体外培养的药敏结果不能准确的反映出细菌对该种药物真实的耐药情况,进而不能对药效进行准确的判断。本研究中所用到的 Poloxamer 是由聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚所形成的新型无毒辅料,其对皮肤黏膜无刺激性和过敏性,能增强难溶性药物的溶解度,可供肌肉、皮下、静脉注射应用^[14]。此外,Poloxamer 还具有热敏溶胶-凝胶转变的特性。在较低温度时为液态,在接近人体温度是呈软凝胶状。其在皮下或肌肉可以形成药物储库,使药物缓慢释放吸收。同时,Poloxamer 对油脂有很强的乳化作用,可以将一些油溶液乳化而形成 O/W 型乳剂或福乳剂供静脉注射,具有一定的靶向作用^[15]。目前,虽然有外国学者对其耐药性进行了相关的报道^[16],但是其作用机制尚未完全研究清楚。因此,人们在今后应更加致力于对于 Poloxamer 特性的研究与探讨,以便于尽早准确模拟出生物被膜菌在人体内的真实药物敏感性,从而找到治疗生物被膜菌相关感染性疾病更加简洁、有效的方法。

本研究结果表明,生物被膜菌在普通 MH 培养基上耐药性与 Poloxamer 培养基上的耐药性差异有统计学意义,生物被膜菌在 Poloxamer 培养基上的耐受性更强。Poloxamer 可以较为真实的表现出生物被膜菌在人体内对抗菌药物的耐受情况。

参考文献

[1] Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and

- antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 246-251.
- [2] 王睿. 细菌生物被膜耐药屏蔽及其防治[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2004, 3(1): 61-66.
- [3] Saenz JB, Doggett TA, Haslam DB. Identification and characterization of small molecules that inhibit intracellular toxin transport [J]. *Infect Immun*, 2007, 75(9): 4552-4561.
- [4] Clutterbuck AL, Cochrane CA, Dolman J, et al. Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2007, 6(10): 2-7.
- [5] Souza JC, Henriques M, Oliveira R. Do oral biofilms influence the wear and corrosion behavior of titanium[J]. *Biofouling*, 2010, 26(4): 471-478.
- [6] 王睿, 陈迁, 方向群, 等. 尿激酶或蚓激酶与氟罗沙星联合应用对细菌生物被膜的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(11): 675-678.
- [7] 欧元祝, 朱于莉, 陈洁敏, 等. 表皮葡萄球菌 *AtlE* 蛋白介导生物膜起始黏附的相关机制[J]. *复旦大学学报: 医学版*, 2006, 33(5): 569-573.
- [8] Juang YC, Adav SS, Lee DJ. Strains of internal biofilm in aerobic granular membrane bioreactors[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1987-1993.
- [9] Dallo SF, Weitao T. Insights into acinetobacter war-wound infections, biofilms, and control [J]. *Adv Skin Wound Care*, 2010, 23(4): 169-174.
- [10] Rasmussen TB, Bjamsholt T, Skindersoe ME, et al. Screening for quorum-sensing inhibitors(OSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector[J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(5): 1799-1814.
- [11] Zijngje V, van Leeuwen MB, Degener JE, et al. Oral bio-film architecture on natural teeth[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): 9321-9326.
- [12] Rodrigues DF, Elimelech M. Toxic effects of single-walled carbon nanotubes in the development of *E. coli* biofilm[J]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44(12): 4583-4589.
- [13] 汪长中. 中药抗细菌生物膜研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(4): 521-524.
- [14] 金璐燕, 李娟. 泊洛沙姆 407 在制剂中的应用进展[J]. *药学与临床研究*, 2009, 17(3): 151-154.
- [15] 倪泉兴, 金沈, 罗国培, 等. 聚乳酸羟基乙酸-泊洛沙姆纳米微粒作为 siRNA 载体的可行性[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(3): 65-68.
- [16] Fang JY, Chen JP, Leu YL, et al. Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery[J]. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*, 2006, 4(2): 156-162.

(收稿日期: 2011-09-06)