

分类号: R691.3

密级: 公开

# 兰州大学

## 专业学位研究生学位论文

论文题目 (中文)	新型物理抗微生物敷料预防留置导尿管细菌生物膜形成的效果与机制研究
论文题目 (外文)	Effect and Mechanism of The New Physical Antimicrobial Dressings Prevention Indwelling for Catheter Associated Urinary Tract Infection
研究生姓名	王东敏
学科、专业	外科学
研究方向	外科护理
学位级别	硕士
导师姓名、职称	王志平 教授
论文工作起止年月	2010年09月至2013年03月
论文提交日期	2013年03月
论文答辩日期	2013年05月
学位授予日期	2013年06月

校址: 甘肃省兰州市

## 原创性声明

本人郑重声明：本人所呈交的学位论文，是在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。学位论文中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究成果做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。

本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 王东敏

日期： 2013.5.26

## 关于学位论文使用授权的声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属兰州大学。本人完全了解兰州大学有关保存、使用学位论文的规定，同意学校保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权兰州大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为兰州大学。

本学位论文研究内容：

可以公开

不宜公开，已在学位办公室办理保密申请，解密后适用本授权书。

（请在以上选项内选择其中一项打“√”）

论文作者签名： 王东敏

导师签名： \_\_\_\_\_

日期： 2013.5.26

日期： 2013.5.29

# 新型物理抗微生物敷料预防留置导尿管细菌生物膜形成的效果与机制研究

## 中文摘要

**目的** 通过细菌生物膜体外实验和临床试验，检测新型物理抗微生物喷雾敷料（洁悠神，JUC）预防留置导尿管细菌生物膜形成，从而预防导尿管伴随性尿路感染的效果，探讨其抗菌机制。

**方法** 1、体外实验：在体外建立导尿管细菌生物膜的模型，实验组用 JUC 进行相应处理，对照组用 0.9%生理盐水处理，在扫描电子显微镜（SEM）和激光扫描共聚焦显微镜（CLSM）下观察细菌生物膜的形态。2、临床试验：将泌尿外科术后预期留置气囊导尿管 7 天及以上的患者 60 例，随机分为实验组和对照组各 30 例，实验组留置导尿前用 JUC 处理导尿管，术后用 JUC 进行尿道口护理；对照组用生理盐水进行常规尿道口护理，于导尿管拔除前采集患者中段尿做尿细菌培养，比较两组菌尿发生率并观察用药反应。

**结果** 1、体外实验：SEM 观察可见，经大肠杆菌培养 7 天的对照组导尿管表面有大量细菌聚集形成微菌落，逐渐开始形成细菌生物膜；而实验组导尿管表面有 JUC 抗菌膜结构形成，未见明显的细菌粘附。实验组乳胶导尿管表面细菌粘附、定植、聚集、初步成膜、形成成熟细菌生物膜的时间较对照组均显著延长。JUC 喷洒于乳胶导尿管表面，可使导尿管表面逐渐平滑，不利于细菌的粘附和定植；还可致大肠杆菌变形、破裂、溶解，从而起到杀菌作用。JUC 对乳胶导尿管表面已形成的细菌 BF 也有一定的杀伤作用。同时对粪肠球菌也有抑制作用。CLSM 观察可见，经大肠杆菌培养 7d，实验组与对照组相比导尿管表面多糖与活菌面积、活菌比例明显减少。2、临床试验：对照组尿细菌培养阳性 8 例，菌尿率 26.7%，病原菌分别为大肠杆菌 4 例、粪球菌 2 例、阴沟肠杆菌 1 例、真菌 1 例；实验组尿细菌培养阳性 1 例，菌尿率 3.3%，病原菌为大肠杆菌。实验组菌尿发生率显著低于对照组（ $P < 0.05$ ）。

**结论** 将洁悠神喷洒于导尿管表面可形成物理抗菌膜，能有效预防细菌生物膜的形成，从而减少临床留置导尿管伴随性尿路感染的发生率。

**关键词**：细菌生物膜（BF），导尿管伴随性尿路感染（CAUTI），物理抗菌

# Effect and Mechanism of The New Physical Antimicrobial Dressings Prevention Indwelling for Catheter Associated Urinary Tract Infection

## Abstract

**Objective:** Bacterial biofilm (Biofilm, BF) In vitro experiments and clinical trials, testing new physical antimicrobial excipients (JUC) prevention indwelling catheter the BF formation of the effect to investigate the antimicrobial mechanism.

**Methods:** ①In vitro experiments: Establishing catheter BF in vitro model, the experimental group using JUC appropriate treatment, the control group treated with 0.9% saline, in a scanning electron microscope (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) was observed under BF morphology. ②Clinical trials: expected Urology postoperative indwelling balloon catheter seven days and more than 60 patients were randomly divided into the experimental group and the control group, 30 cases in each experimental group catheterization the JUC treatment catheter after with JUC care; care control group with saline conventional urethra, collecting urine prior to catheter removal for bacterial culture were compared the incidence of bacteriuria and observed drug reactions.

**Results:** ① In vitro experiments: SEM observation visible catheter surface of 7-day control group gathered a large number of bacteria, E. coli culture has formed a mature biofilm of bacteria; catheter surface while the experimental group JUC antibacterial film structure formation, no or only see a small amount of bacterial adhesion. The experimental group latex catheter surface bacterial adhesion, aggregation, initial film-forming to form mature bacterial biofilm was significantly longer than the control group. The JUC is sprayed on the surface of latex catheter, the catheter surface can gradually smooth, is not conducive to bacterial adhesion and colonization; allows E. coli the JUC through physical adsorption deformation, rupture, dissolution, and thus play a bactericidal action. JUC Enterococcus faecalis killing effect. The CLSM observed, 7d, the experimental group and the control group compared to the catheter surface polysaccharides and viable cells area, viable cells significantly reduced the proportion of E. coli culture. ②clinical trials: the control group urine bacterial culture was positive in eight cases, bacteriuria rate of

26.7%, the pathogens were E. coli 4 cases, fecal bacteria, Enterobacter cloacae, fungi; experimental group urine bacterial culture positive cases of bacteriuria rate of 3.3%, the pathogen E. coli. Bacteriuria incidence of the experimental group was significantly lower than the control group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** JUC spray on the catheter surface of physical antimicrobial film can be formed, to be effective in preventing the formation of BF to reduce catheter Associated Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection, CAUTI) incidence.

**Key words:** Bacterial biofilm (BF), Catheter Associated Urinary Tract Infection (CAUTI), Physical antibacterial

## 目录

中文摘要 .....	I
Abstract .....	II
目录 .....	IV
前言 .....	1
第一部分 课题设计 .....	4
1.1 研究目的 .....	4
1.2 技术路线 .....	5
第二部分 体外实验 .....	5
2.1 实验材料 .....	5
2.2 实验方法 .....	8
2.3 结果 .....	10
第三部分 临床试验 .....	20
3.1 试验对象 .....	20
3.2 试验方法 .....	20
3.3 统计学方法 .....	21
3.4 试验结果 .....	21
第四部分 讨论 .....	23
4.1 BF 形成机制及 CAUTI 感染途径的讨论 .....	23
4.2 引起 CAUTI 细菌种类的讨论 .....	24
4.3 CUATI 的防治方法 .....	24
4.4 不同导尿管材质与 CAUTI 的关系 .....	25
4.5 JUC 抗菌效果及机制讨论 .....	25
4.6 JUC 最佳用药次数的讨论 .....	26

4.7 试验数据与抗菌药物关系的讨论 .....	27
结论 .....	28
参考文献 .....	29
附图 .....	32
综述 .....	35
综述参考文献 .....	40
在学期间的研究成果 .....	42
中英文缩语对照表 .....	43
致谢 .....	44

## 前言

尿路感染 (urinary tract infection, UTI) 是临床的常见疾病, 其在全球范围内发病率均很高。在我国, UTI 在医院获得性感染 (hospital acquired infections, HAI) 中的比例很高, 约为 40%, 是引起医院获得性感染的重要因素。其中, 与留置导尿管有关的尿路感染约占 80%<sup>[1, 2]</sup>, 被称为留置导尿相关性尿路感染 (catheter-associated urinary tract infection, CAUTI)。有研究报道, 在美国, 每年需要接受各种插管治疗的病人就多达 500 万人<sup>[3]</sup>, 约有 15~25% 的患者在短期住院治疗中需要接受留置导尿操作<sup>[4]</sup>。发生 CAUTI 的患者超过 100 万<sup>[5]</sup>, 大于 65 岁的老人使用留置尿管比例是 5.4%<sup>[6]</sup>。留置导尿管与发生尿路感染的相关性高达 95%<sup>[7]</sup>。而 Gould CV、Donlan RM、Sorbye LW 等人研究表明 CAUTI 的发生和导尿管留置天数的增长有关, 不管是开放式导尿还是闭合式导尿, 一周内的短期置管可导致 CAUTI 的几率高达 10~50%, 而且 CAUTI 的比率会随着导尿管留置天数的增加每天增长 3~10%, 30 天后可达到 100%<sup>[8-10]</sup>。CAUTI 不仅多见, 而且引起的危害很大, 在美国 CAUTI 使住院时间增加 2.4 到 4.5 天<sup>[11]</sup>, 因诊断和治疗 CAUTI 的平均花费为 589 美元 (不包括延期出院的费用)<sup>[12]</sup>, 加上住院等费用, 每人平均增加 2800~3800 美元。美国疾病预防控制中心 CDC 的文件指出每年美国 UTI 导致超过 13000 位患者死亡<sup>[10]</sup>。因而 CAUTI 对留置导尿患者有巨大的影响, 成为国内外众多医务人员关心和研究的难题。

Burton E、Trautner BW 等人发现导致 CUATI 的感染率居高不下的原因是导尿管表面形成的细菌生物膜阻碍了抗生素对细菌的作用<sup>[11, 13, 14]</sup>。对于 CUATI 的发生机制, “细菌生物膜理论”已经被普遍认同。细菌生物膜 (Biofilm, BF) 是以细胞外基质围绕包裹细菌形成, 形成特殊的像蜂巢一样的结构, 有非常复杂生态系统<sup>[8, 15-17]</sup>。导尿管表面形成的 BF 结构, 可以使生物膜内的微生物对抗生素、化学杀菌剂和消毒剂产生耐药<sup>[8, 13]</sup>。其耐药机理为: I 生物膜阻碍了抗菌药物对细菌的渗透; II 生物膜改变了病菌生长率; III 生物膜的生长模式可引起其他的生理改变<sup>[8]</sup>。形成生物膜后细菌可以抵御冲洗, 抵抗噬菌作用和抗菌药物<sup>[13, 18]</sup>, 且遗传信息交换的频率远远大于游离细胞<sup>[19]</sup>, 因此耐抗菌素的基因和菌株得以传播。BF 一旦形成, 就会对尿道病原菌起到保护作用, 使细菌逃脱抗菌药物和宿主的免疫应答, 从而使细菌或从成熟的 BF 上脱落的子细胞团, 入侵到其他地方<sup>[8]</sup>。由于 BF 阻碍了抗生素对细菌的作用, 才导致 CUATI 非常难治<sup>[13]</sup>。因而存在于生物膜的细菌比浮游细胞对抗生素的耐药性增加 10-1000 倍<sup>[20]</sup>。

现有的研究旨在探索预防和改变BF形成的新方法, 为了改变生物膜的生长

条件,从而预防BF的形成,人们研究了很多新的技术,包括群体感应干扰素,如呋喃酮、含银导尿管和益生菌<sup>[13, 21-24]</sup>。

在一些随机试验中,抗菌药物涂层的导尿管能减少CAUTI的发生率,但却加重了抗生素耐药的情况<sup>[25]</sup>。尿路病原菌对抗菌药物的耐药率一直不断增长,从CAUTI病例中分离出的约1/4的大肠杆菌和1/3的绿脓杆菌都是耐药的<sup>[10]</sup>。Johnson等人发现含呋喃西林或含银水凝胶涂层的导尿管在抑制BF形成方面有一定效果,但对铜绿假单胞杆菌则没有作用<sup>[21, 22]</sup>。美国CDC的研究指出,表面有银涂层的导管与标准导尿管在预防菌尿症上没有区别,银合金导管在留置1周内可减少菌尿症的作用<sup>[9]</sup>。而Burton等人研究发现新型OPDM-plus-PS涂层可以抑制铜绿假单胞菌和表皮葡萄球菌对导管的粘附<sup>[14]</sup>,但这些带涂层的导尿管目前只能在短期导尿管植入中才能起到预防CUATI的作用<sup>[13]</sup>。最近Stickler等人发现导尿管上形成的BF可产生微生物群体感应信号(quorum-sensing signal),这些感应信号可控制生物膜形成的基因表达,如果破坏这些信号的产生,就能阻止生物膜形成<sup>[26]</sup>。例如,通过控制群体感应信号来抑制绿脓杆菌的突变,从而使绿脓杆菌无法成熟为三维结构的生物膜<sup>[27]</sup>。还有人发现一些元素如铁对生物膜形成是必须的营养,而去铁导管也是发展的方向,但是现在还没有临床试验<sup>[13]</sup>。益生菌也是一个研究方向, Trautner等人发现利用非致病型大肠杆菌可以减少致病菌和CAUTI的感染率<sup>[28, 29]</sup>。虽然这些方法也有一定的前景,但目前还没有确证,而且在成本-效果方面也有问题。

由于在临床工作中还没有找到确切的、能有效预防BF形成的方法,因此我们力求寻找一种新的、安全的、更为有效的抗菌方法。首先我们通过基础实验探索物理抗微生物敷料JUC预防BF形成的机理,然后转向临床试验、全国多中心研究,观察其在中国地区临床试验中预防CAUTI的效果。

实验所用JUC由南京神奇科技有限公司生产并免费提供,其主要成分为有机硅季铵盐,是一种新型的物理抗微生物喷雾敷料,将它喷洒在导尿管上,待其干燥后可形成一层隐形的纳米物理抗微生物涂层,即JUC抗菌膜,其带正电荷,可通过静电力的作用强力吸附细菌、病毒等带负电荷的病原微生物,使其破裂致死,从而阻止BF的形成,由于其采用纳米技术、通过物理方法抗菌,不会产生耐药。JUC已在2002年获得了中国食品药品监督管理局的产品注册,并于2006年获得了美国FDA认证。

中国近期研究发现,JUC长效物理抗微生物敷料可预防导尿管BF的形成。但是目前相关临床研究数据尚不完善,对其预防导尿管表面BF形成的效果、机制及影响因素等基础研究方面也是一项空白。因此,我们将通过相关体外实验和临床试验,用JUC处理导尿管,并在扫描电子显微镜和激光扫描共聚焦显微镜下观

察导尿管表面BF形成的情况，探讨JUC预防留置导尿管BF形成及CUATI的效果、机制和影响因素。

## 第一部分 课题设计

### 1.1 研究目的

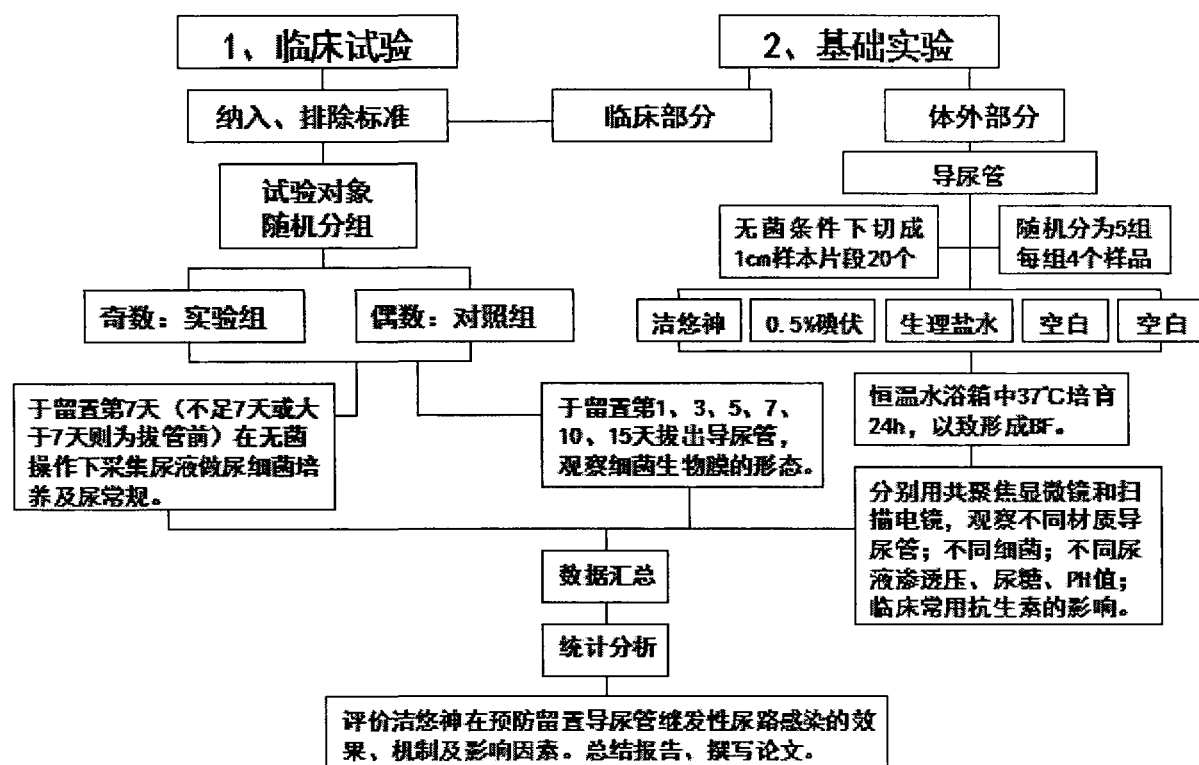
#### 1.1.1 体外实验

- (1). 检测 JUC 预防 BF 的效果与机制
- (2). 确定 JUC 使用时的最佳用药时间及次数
- (3). 检测 JUC 对不同细菌、不同材质导尿管表面 BF 的作用差异
- (4). 检测 JUC 对导尿管表面已形成的成熟 BF 的杀伤作用
- (5). 检测 JUC 对 BF 形成各阶段形态的影响
- (6). 观察 JUC 对不同尿糖环境下 BF 的作用差异

#### 1.1.2 临床试验

- (1). 检验 JUC 预防留置导尿伴随性尿路感染的效果
- (2). 观察用药反应
- (3). 成本-效果分析

## 1.2 技术路线



## 第二部分 体外实验

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验设备及仪器

JSM-6380 扫描电子显微镜

激光扫描共聚焦显微镜

全自动高压蒸汽灭菌器

环氧乙烷灭菌箱

S2 型电热恒温水浴箱

恒温震荡仪

鼓风干燥箱(DHG-9070A 型)

6551 型电动搅拌器

-80℃超低温冰箱

-4℃冰箱

恒温摇床

电子 PH 计

CW-CJ-18 标准超净工作台

GMI302 型电子天平

恒温培养箱

超微量分光光度仪

微量移液器 200ul、100ul、50ul、10ul

FQ2 型紫外线消毒车

CO<sub>2</sub> 真空干燥仪

Heal Force NW 超纯水系统

数码相机	上海三申公司
图象分析系统	上海上海群联文教模具厂
8mm 爬片	苏州净化设备厂
日本电子公司	Mettler Toledo 公司产品
德国西门子	Heraeus GBB16 中国北京
日本三洋 MLS-3570	美国 Nanodrop ND2000
北京众磊生物科技发展有限公司	法国 France Gilson
上海医疗器械七厂	福州医疗器械厂
上海医疗器械七厂	上海精宏实验设备有限公司
上海精宏实验设备有限公司	德国 Sartorius
上海群联文教模具厂	日本佳能
日本 SANYO 公司	美国 Image-proplus
青岛海尔公司	美国 NEST

打孔器、玻璃培养皿、6/12/24/96 孔板（美国 NEST）、细胞培养瓶、塑胶冻存盒、冻存管、高压灭菌盒、10ml/15ml 试管，试管架、试管塞，Eppendorf 管、500ml 锥形瓶、烧杯、移液枪放置架、10ul/100ul/1000ul 枪头、1000ml 量筒、酒精灯、载玻片、盖玻片、封口膜、无菌手套、滤纸、注射器、眼科镊、记号笔等。

### 2.1.2 实验试剂

洁悠神（JUC）	由南京神奇科技有限公司免费提供
AO	购自 Sigma 公司
Goldview（EB替代物）	购自 Sigma 公司
PI	购自 Sigma 公司
FITC-ConA	购自 Sigma 公司
50%戊二醛固定液	购自上海生工
PBS缓冲液	购自上海双螺旋
生理盐水	购自甘肃扶正药业股份有限公司
金钼	购自上海生工
胰蛋白胨	购自美国 OXOID
琼脂粉	购自上海生工
酵母提取物	购自上海生工
30%甘油	购自上海生工

### 2.1.3 菌种来源

实验所用的大肠埃希菌（ATCC-25922）、粪肠球菌（ATCC-33186）标准菌株均由兰州大学第二医院检验中心微生物室免费提供。

### 2.1.4 主要溶剂的配置

#### (1). PBS 缓冲液（pH7.4）

NaCl	4.00g
KCL	0.10g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.12g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.75g

精确称取NaCl 4.00g、KCL0.10g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.12g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O1.75g于烧杯中，加等离子水至200ml，搅动搅拌器使其彻底溶解后再加等离子水至500ml，继续搅动5min，用NaOH将溶液pH值调至7.4，用滤纸将多余的杂质滤去，121℃高压灭菌20min后封闭、常温、避光保存备用。

#### (2). LB培养液配制：500ml

胰蛋白胨	2.5g
酵母提取物	NaOH（1mol/L）
NaCl	等离子水
5g	0.5ml
2.5g	500ml

称取胰蛋白胨5g、酵母提取物2.5g、NaCl2.5g于培养瓶中，加入200ml等离子水，缓慢匀速搅动使其溶解，再加300ml等离子水，溶液总量500ml。按照上述方法继续搅动5min，同时用NaOH将溶液pH调至7.4，用滤纸滤去多余杂质，121℃高压灭菌20min，封闭、常温、无菌环境中保存备用。

#### (3). LB琼脂平板配制：500ml

胰蛋白胨：5g
酵母提取物：2.5g
1.5%琼脂粉：7.5g
0.5%NaCL：2.5g
NaOH（1mol/L）：0.5ml
双蒸水：500ml

分别称取胰蛋白胨5g、酵母提取物2.5g、1.5%琼脂粉7.5g和0.5%NaCL：2.5g于锥形瓶中，加双蒸水至500ml，用氢氧化钠调pH至7.4，121℃高压灭菌20min，

取出锥形瓶将高温溶剂倒入无菌培养皿中，每皿约10ml，加盖，置于无菌环境中待其冷却，形成LB固体培养板，无菌环境、-4℃保存备用。

(4). 2.5%戊二醛磷酸缓冲液：100ml

0.2mol/LPBS：50ml

25%戊二醛：10m

双蒸水：40ml

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 实验分组

(1)按标本处理方法随机分为实验组（JUC 组）和对照组（NS 组）。实验组用 JUC 进行相应的标本处理，对照组则用 0.9%生理盐水处理标本。

(2)根据实验内容进行随机分组，如按照导尿管材质分组、按照细菌的种类分组、按照不同时间点细菌生物膜的形态分组、按照 JUC 不同用药次数分组、按照细菌生物膜形成过程的六个阶段分组等等。

### 2.2.2 标本处理

#### (1). 基本处理流程

①实验用导管样品制备：取无菌包装的硅胶、乳胶、橡胶、塑胶导尿管各 2 根，将导管用打孔器打成直径 6mm、厚 0.1mm 圆片，按不同材质分类包装后放入环氧乙烷灭菌箱中灭菌备用。取乳胶断片 20 个，再将 20 个试验片断随机分成 A、B、C、D、E5 个组，每组 4 个。A 组导尿管样品放入 JUC 中浸泡 1min，内、外壁各浸泡 30s，取出置于无菌滤纸上，待样品表面干燥后再重复上述操作 1 次，备用；B 组用生理盐水以相同方式处理；C、D 组无需处理。

②标准菌株活化与封存：取-80℃冰箱中冻存的菌株，用无菌牙签挑取少许冻存的菌种于无菌试管中，加 LB 培养液 3ml，置于 37℃恒温振荡仪中震荡 18h，取菌液 100ul，稀释 25 倍，获得实验所需菌液，将菌液用 30%甘油封存于 EP 管中，装入冻存盒，置于-80℃超低温冰箱中保存备用。

③细菌悬浊液制备：从-80℃超低温冰箱中取出冻存菌液，迅速置于 37℃水浴中使其快速融化，防止冰晶损害。取 10ul 菌液于无菌试管中，加 LB 培养液 3ml，置于 37℃恒温振荡仪中摇菌 3h，将摇好的菌液梯度稀释，取菌液 10ul、LB 培养液 100ul 于 LB 琼脂平板上涂板接种，37℃恒温培养箱中培养 24 小时，采用平板计数法调整细菌浓度为  $10^6$ CFU/ml 备用。

③形成BF: 准备6孔板2个, 每孔依次加入LB细菌培养液1ml和制备好的大肠杆菌悬浊液1ml, 然后将A、B、C、D组导尿管样品分别依次放入4个孔中。准备同样标本2组, 将2块6孔板置于电热恒温水浴箱中37℃培育24h, 以致形成BF。

## (2). 镜检

①镜检前准备: A、B组标本用10ml无菌PBS反复冲洗3遍, 1片待SEM镜检, 1片待CLSM镜检。C组标本PBS冲洗后用JUC浸泡1min, 内、外面各30s, 取出置于无菌滤纸上待干燥后重复此操作1次, 然后放回带细菌悬液6孔板中继续培养; 而D组则用无菌生理盐水以相同方式处理后放回6孔板中继续培养。每8h用JUC或生理盐水处理标本1次, 每24h从孔中抽出1ml菌液弃去, 同时添加新鲜无菌LB培养液1ml, 于相应的观察时间点终止标本处理。

②SEM镜检标本处理: 把每个标本样品取出, 用10ml无菌PBS液反复冲洗3遍, 洗去游离细菌, 用2.5% (vol/vol) 戊二醛固定1h, 再用PBS冲洗, 然后用乙醇脱水。样本经CO<sub>2</sub>真空干燥, 然后镀上金钼。用SEM检测BF形成情况, 摄图并记录(记录表见附件)。<sup>[30]</sup>

③CLSM镜检: 按试剂盒说明配制荧光染液, 将标本依次放入配制好的荧光染剂中, 在常温下进行避光染色15min后, 用无菌PBS10ml反复冲洗3遍, 洗去多余染剂和浮游细菌。使用CLSM镜检、观察、摄像时选择激发光为波长488nm的氩激光, 在每个标本中随机选取1个视野(物镜×10, 目镜×10)进行观察, 观察单位视野中BF菌落数, 并拍摄荧光图像; 每个视野随机选择一处BF, 测量BF的厚度, 并对BF进行微型CT扫描, 即逐层扫描, 均扫描20层(物镜×10, 目镜×20), 由BF与切片相贴的内层向外层扫描。随后根据逐层扫描所得的断层图像中红色荧光与绿色荧光的面积来计算BF第5、10、15层的活菌比例, 所得数据代表BF内层、中间层和外层的活菌分布情况。<sup>[31]</sup>

## (3). 死/活菌双荧光染色法

采用AO/EB进行双荧光染色。AO为吖啶橙, 染色浓度100ug/ml, 标记活细菌, 用蓝光激发, 显示绿色荧光, 激发光为488nm; EB为溴化乙锭, 由于其毒性大, 本实验使用EB替代物goldviewI, 染色浓度为100ug/ml, 标记死细菌, 用绿光激发显示红色荧光, 激发光为312nm。配制时精确称取AO、EB各1mg, 分别溶于10mlPBS (PH7.2) 中, 是指配制成两种100ug/ml的储备液, 用前等量摇匀, 常温下避光染色15min, 剩余储备液-4℃避光保存备用。

## (4). 细菌/多糖双荧光染色法

采用PI/FITC-ConA进行双荧光染色。PI为碘化丙啶, FITC-ConA为刀豆球蛋白, 染色浓度均为50ug/ml。PI标记细菌DNA, 呈红色荧光, 激发光为535nm, 发射光为617nm。FITC-ConA标记细菌多糖, 呈绿色荧光, 激发光为488nm, 发

射光为525nm。染色时,用无菌PBS (PH7.2) 10ml反复冲洗标本3遍,无菌滤纸吸干多余水分,2.5%戊二醛固定1h, PBS再次洗片后用FITC-ConA4℃避光染色30min, PBS冲洗后, PI4℃避光染色15min, PBS冲洗后CLSM镜检。

(5).平行重复实验两遍。按其他实验目标和内容分组的实验方法与以上实验步骤基本相同。

### 2.2.3 结果观察与数据处理

#### (1). 结果观察

实验标本处理后分别在扫描电子显微镜 (SEM)、激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 下观察。用 SEM 观察标本时,随时调整最佳视野、对比度、灰度、聚焦、像散,待图像清晰时,进行显微摄像。在本实验中选择放大倍数为 1000×、2000×、4000×、8000×, CLSM 放大倍数为 80×、200×。选取有意义的图像保存、整理并进行数据分析。

#### (2). SEM 镜检结果分析

SEM 具有可直接观察较大样品表面形态、结构的特点和优势,在 1000×、2000×倍镜视野下可观察各种材料、BF 等的宏观结构,在 4000×、8000×倍镜下可清晰的观察到单个大肠杆菌及 BF 的形态和特征。在 4000×、8000×倍镜下也可观察到粪肠球菌的形态结构。图像清晰直观。

#### (3). CLSM镜检结果的数据处理

用 CLSM 观察标本,同时在 CLSM 下选择相应的滤片。二维图像每张测 5 个视野。三维图像逐层扫描 20 层,进行 CLSM 摄片和图像分析(Image-pro plus 6.0 专业图片自动分析软件)。使用 SPSS13.0 统计软件,分析 JUC 组和生理盐水组导尿管表面 BF 细菌总数、死菌面积、活菌面积及活菌比例。用卡方检验分析实验组和对照组之间是否具有统计学意义 (有统计学意义用  $P < 0.05$  表示)。

## 2.3 结果

### 2.3.1 JUC 抗菌膜的电镜形态

喷洒 JUC 后,可在导尿管表面形成一层灰白色、泡沫状的 JUC 抗菌膜 (见图 1)。

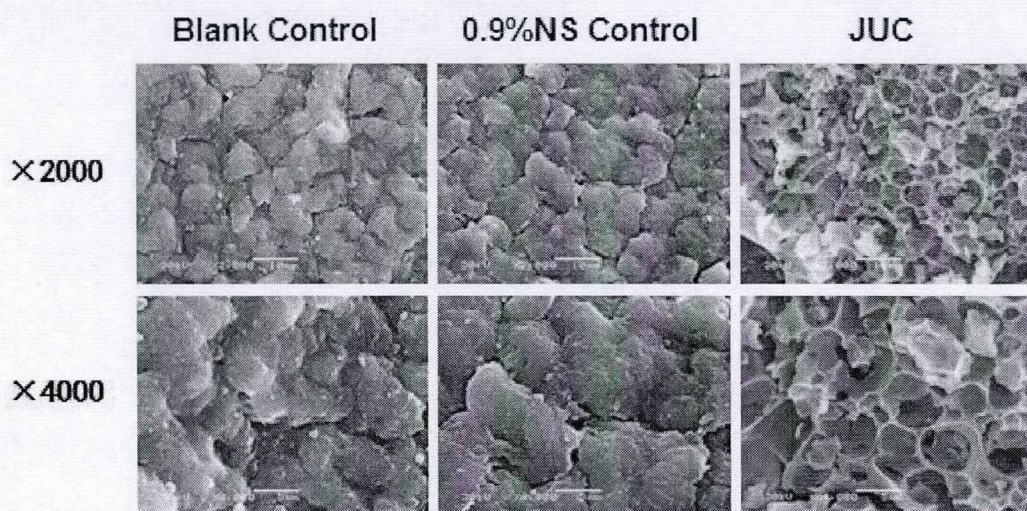


图1 JUC 抗菌膜的电镜形态

### 2.3.2 JUC 最佳用药次数测定 (SEM, ×4000)

用 NS 处理导尿管表面 1 次/日 (q24h)、2 次/日 (q12h)、3 次/日 (q8h)、4 次/日 (q4h)、6 次/日 (q6h)，未起到明显的抑菌作用，导尿管表面均有大量大肠杆菌生长，形成成熟 BF。而用 JUC 处理导尿管，1 次/日 (q24h) 可见导尿管表面有大肠杆菌生长，聚集；2 次/日 (q12h) 可见导尿管表面少量大肠杆菌生长，粘附；3 次/日 (q8h)、4 次/日 (q4h)、6 次/日 (q6h) 导尿管表面均未见大肠杆菌生长。

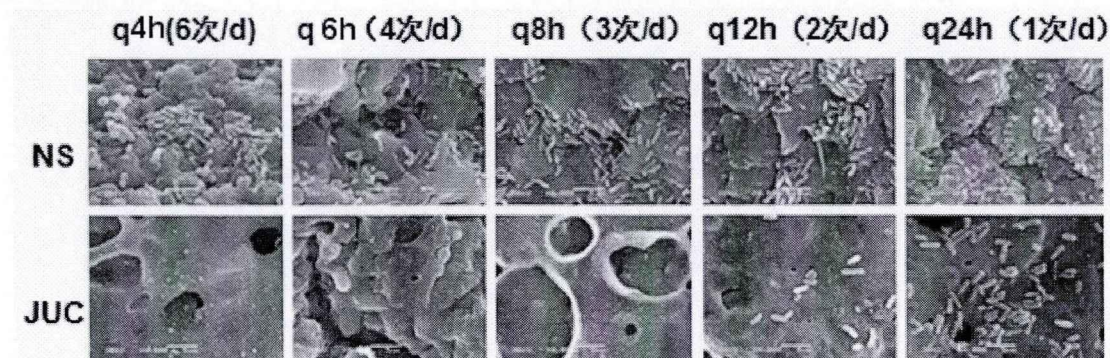


图2 JUC 最佳用药次数测定 (SEM, ×4000)

### 2.3.3 JUC 对大肠杆菌的作用及机制

#### (1). 大肠杆菌细菌 OD 值测定

JUC 组: OD<sub>600</sub>=0.044, NS 组: OD<sub>600</sub>=0.1。JUC 组大肠杆菌 OD 值低于 NS 组，说明其细菌浑浊度低于 NS 组 (见图 3)。

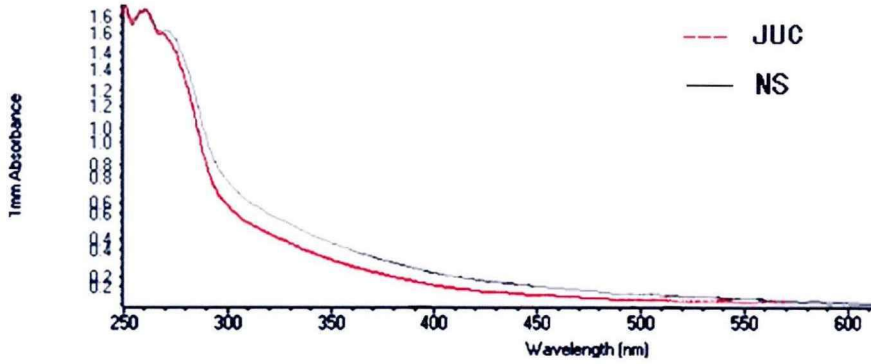


图3 大肠杆菌细菌 OD 值测定

(2). 菌落计数

①游离细菌菌落计数（见表1）

用游离大肠杆菌做细菌培养。NS 组菌夜摇菌 4h、菌夜稀释  $10^6$  倍仍有细菌生长，菌夜稀释  $10^4$  倍则细菌生长密集成片，无法计数（\*）；JUC 组各摇菌时间和稀释倍数均无细菌生长。

表1 游离细菌菌落计数示

摇菌时间 稀释倍数	4h		6h		8h		12h		24h	
	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC
$\times 10^6$	3	0	4	0	6	0	1	0	8	0
$\times 10^4$	*	0	*	0	*	0	*	0	*	0
$\times 10^2$	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0
$\times 1$	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0

②BF 脱落细菌菌落计数（见表2）

用大肠杆菌 BF 脱落细菌做细菌培养。NS 组菌夜摇菌 4h、菌夜稀释  $10^6$  倍即有细菌生长，菌夜稀释  $10^4$  倍菌落增多，菌夜稀释  $10^2$  则细菌生长密集成片，无法计数（\*）；JUC 组各摇菌时间和稀释倍数均无细菌生长。

表2 BF 脱落细菌菌落计数

摇菌时间 稀释倍数	4h		6h		8h		12h		24h	
	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC	NS	JUC
$\times 10^6$	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0
$\times 10^4$	8	0	4	0	3	0	7	0	5	0
$\times 10^2$	*	0	*	0	*	0	*	0	*	0
$\times 1$	/	0	/	0	/	0	/	0	/	0

(3). CLSM 镜检结果

① 经大肠杆菌培养 16h、7d 的 CAUTI 形态（CLSM,  $\times 200$ ）（见图4）

经 16h 培养：NS 组导尿管表面细菌聚集，形成许多微菌落，初步开始形成 BF，微菌落被 PI 染为红色（见图 NS/16h）。JUC 组导尿管上无 BF 形成，未被染色，显微镜视野中仅见少量游离细菌呈现出红色亮点，其余无异常（见图 JUC/16h）；经 7d 培养：NS 组导尿管表面形成较厚的 BF，其着色均匀、致密、深染，由于细菌过度繁殖，交联聚集形成立体的细菌团块，尿管表面呈现出粗糙和凹凸不平（见图 NS/7d）。JUC 组导尿管表面只形成少量微薄的膜状结构，表面光滑、色浅，其余无异常（见图 JUC/7d）。

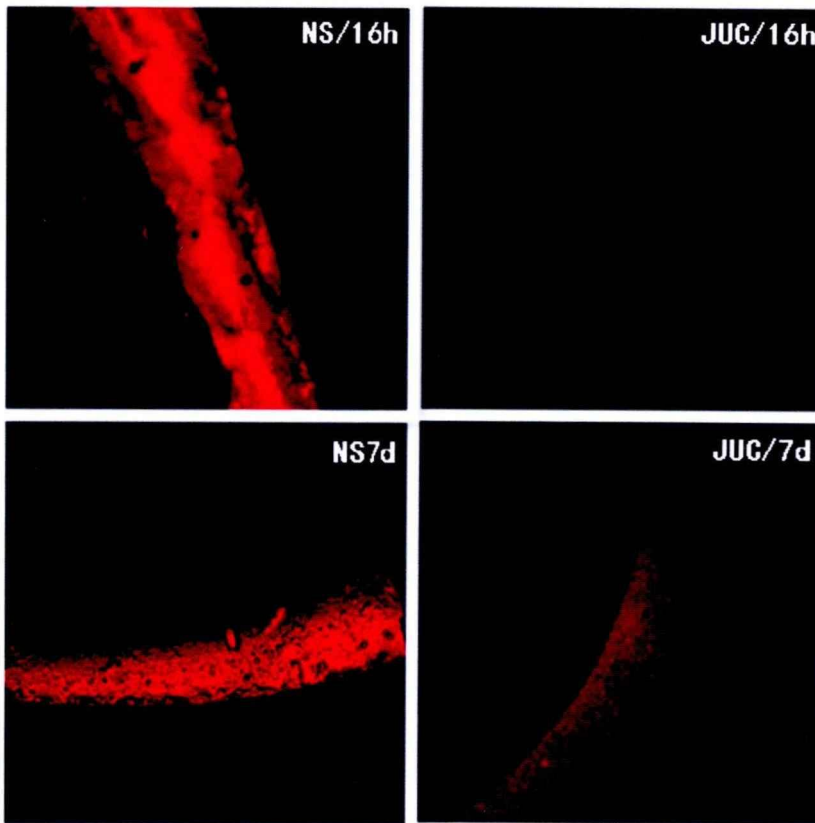


图 4 经大肠杆菌培养 16h、7d 的 CAUTI 形态（CLSM， $\times 200$ ）

## ② 死活菌（CLSM， $\times 200$ ）（见图 5）

在平面扫描、逐层扫描、三维立体成像中均可看到，经大肠杆菌培养 24h，NS 组导尿管表面已形成成熟的 BF，BF 中存在大面积活菌（绿色），仅有极少数死菌（红色）；而 JUC 组导尿管表面无 BF，仅有极少数游离活菌，可看到大面积死菌分布。

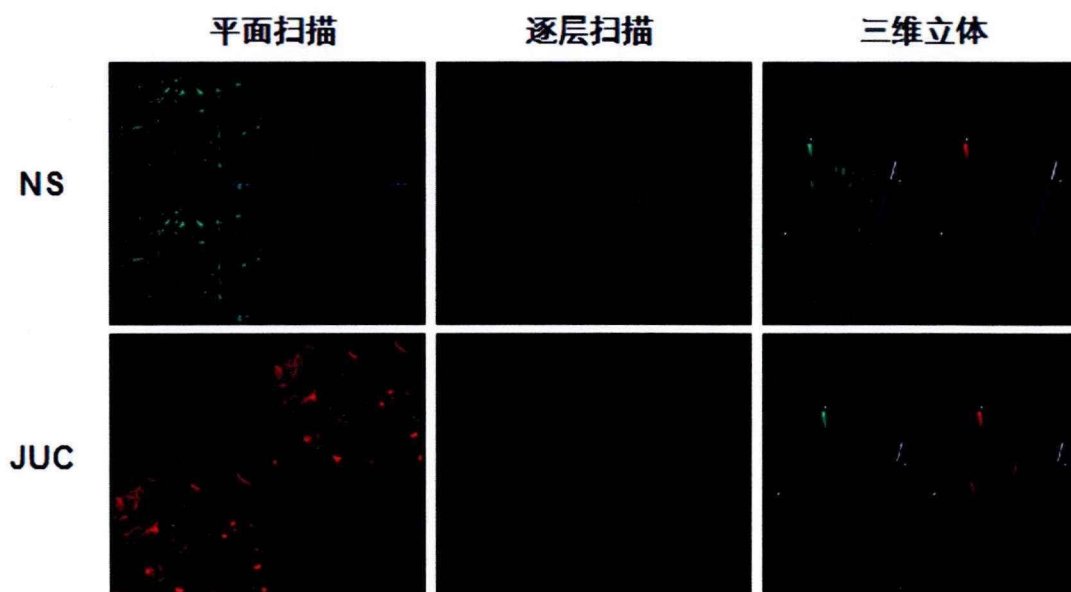


图 5 死活菌 (CLSM,  $\times 200$ )

### ③活菌比例 (见表 3)

经大肠杆菌培养 24h, 用 CLSM 对导尿管表面进行逐层扫描 (20 层), NS 组第 5 层、10 层、15 层、20 层活菌面积、活菌比例均明显高于 JUC 组。而 JUC 组的细菌面积总数 (活菌面积+死菌面积)、死菌面积均高于 NS 组。从 BF 外层向内层, 活菌比例逐渐减少。

表 3 活菌比例

扫描层数	NS			JUC		
	活菌面积	死菌面积	活菌比例	活菌面积	死菌面积	活菌比例
5 层 (内)	68%	19%	78.16%	5%	47%	9.61%
10 层	78%	11%	87.76%	4%	51%	7.27%
15 层	81%	5%	94.18%	10%	68%	12.80%
20 层 (外)	83%	2%	97.65%	7%	59%	10.60%

### 2.3.4 JUC 对粪杆菌的作用 (SEM, $\times 4000$ ) (见图 6)

经粪肠球菌培养 7d, NS 组导尿管表面可见粪肠球菌, 而 JUC 组导尿管表面未见粪肠球菌

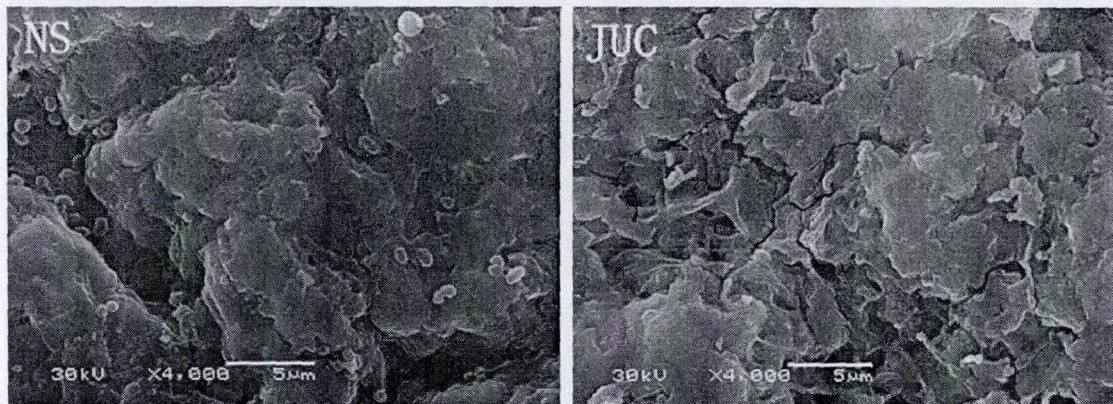


图6 JUC对粪球菌的作用 (SEM, ×4000)

### 2.3.5 JUC 对不同材质导尿管表面 BF 的作用差异

#### ①不同材质导尿管的电镜形态及特点 (SEM, ×2000)

在电镜 2000 倍视野下, 可见硅胶和塑胶导尿管表面光滑、无裂隙; 乳胶导尿管表面凹凸不平, 无裂隙; 而橡胶导尿管表面凹凸不平, 有裂隙, (见图 7)

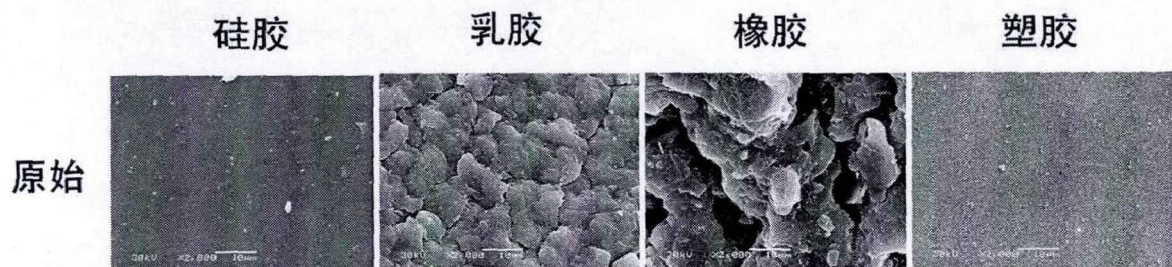


图7 不同材质导尿管的电镜形态及特点 (SEM, ×2000)

#### ②不同材质导尿管表面形成成熟 BF 的时间 (见表 4)

硅胶导尿管表面不易形成 BF; 其次是塑胶, 最后是乳胶和橡胶

表 4 不同材质导尿管表面形成成熟 BF 的时间

	NS				JUC			
	硅胶	乳胶	橡胶	塑胶	硅胶	乳胶	橡胶	塑胶
24h	粘附	成熟 BF	成熟 BF	粘附	无	无	无	无
48h	聚集	/	/	成熟 BF	无	无	无	无
7d	成熟 BF	/	/	/	无	无	无	无

#### ③不同材质导尿管表面 BF 电镜形态 (SEM, ×2000) (见图 8)

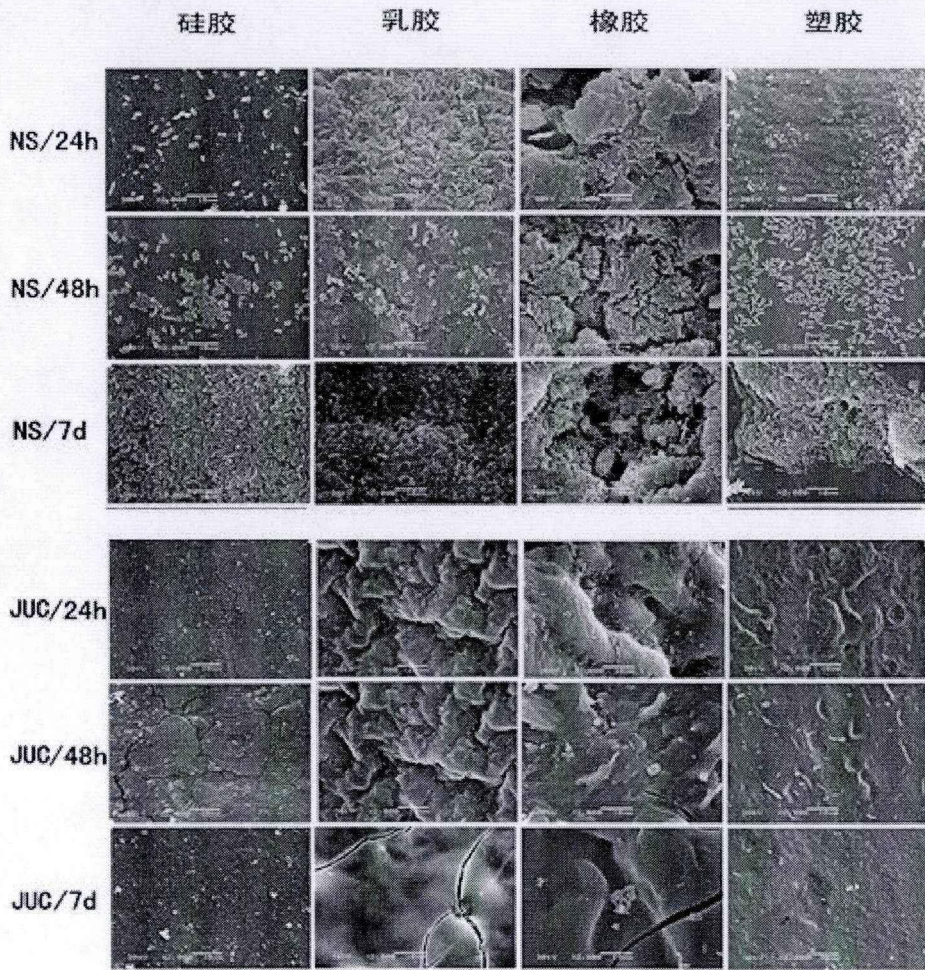


图 8 不同材质导尿管表面 BF 电镜形态 (SEM,  $\times 2000$ )

### 2.3.6 JUC 对 BF 形成 6 个过程时间的影响

(1). 乳胶导尿管表面 BF 形成各阶段的电镜形态 (SEM,  $\times 2000$ ) (见图 9)

NS 组乳胶导尿管表面 8h 即可有大肠杆菌粘附、12h 细菌定植、16h 细菌聚集形成微菌落、24h 可形成成熟 BF、48h BF 崩解。而 JUC 组乳胶导尿管表面 10d 时出现大肠杆菌粘附、14d 细菌定植、15d 细菌聚集形成微菌落、16d 初步成膜, 18d 形成成熟 BF、22d BF 崩解。JUC 组比 NS 组形成 BF 六个过程的时间均显著延迟。

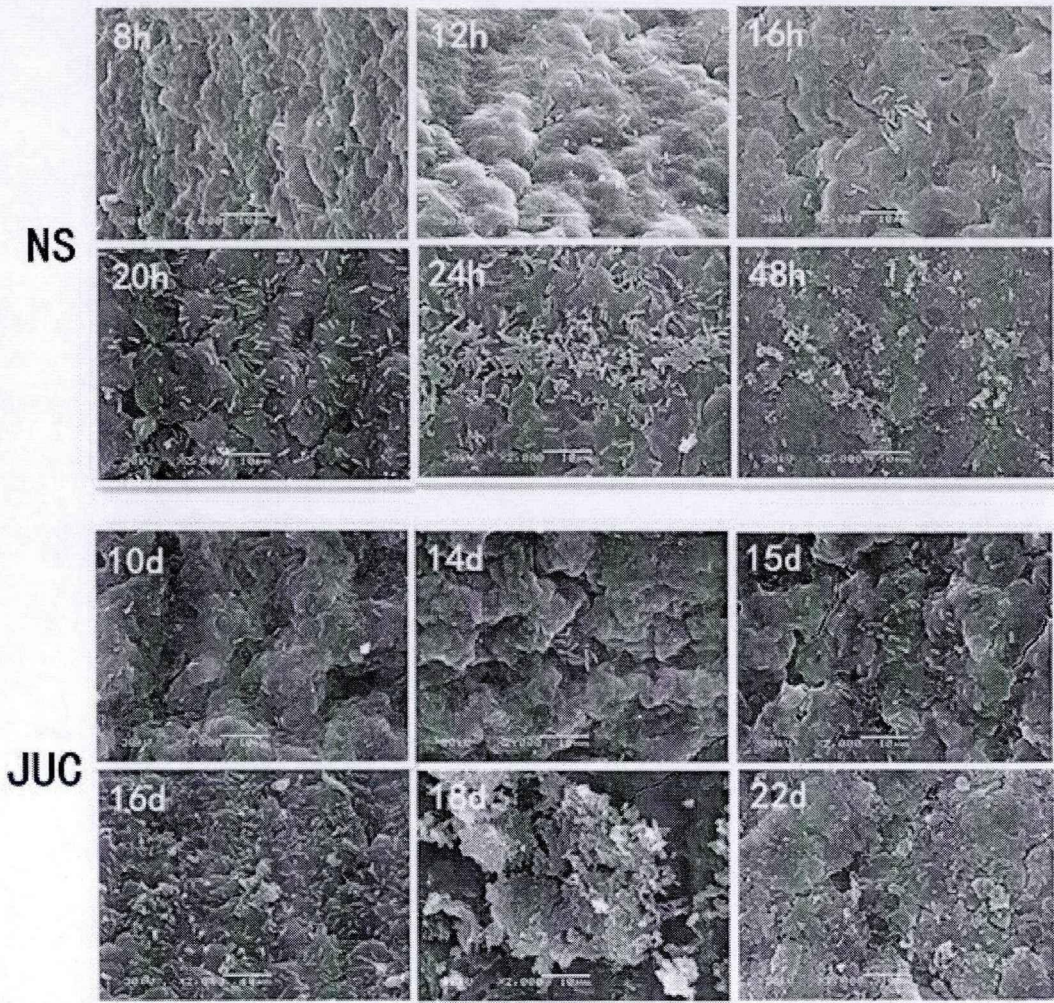


图9 乳胶导尿管表面BF形成各阶段的电镜形态 (SEM, ×2000)

(2). JUC 与 NS 组 BF 形成各阶段的时间差 (见表 5)

表 5 JUC 与 NS 组 BF 形成各阶段的时间差

	NS	JUC	时间差
粘附	8h/0.3d	10d	9.7d
定植	12h/0.5d	14d	13.5d
聚集	16h/0.7d	15d	14.3d
初步形成 BF	20h/0.8d	16d	15.2d
成熟 BF	24h/1d	18d	17d
崩解	48h/2d	22d	20d

### 2.3.7 JUC 对导尿管表面已形成 BF 的杀伤作用

NS 对乳胶导尿管表面已形成的 BF (大肠杆菌培养 24h) 无杀伤作用, 杀伤

实验 7d 后，导尿管表面形成了更密集、更稳固的三维立体结构的 BF。JUC 组乳胶导尿管表面的 BF 随杀伤天数的增加有逐渐减少的趋势(见图 10)。

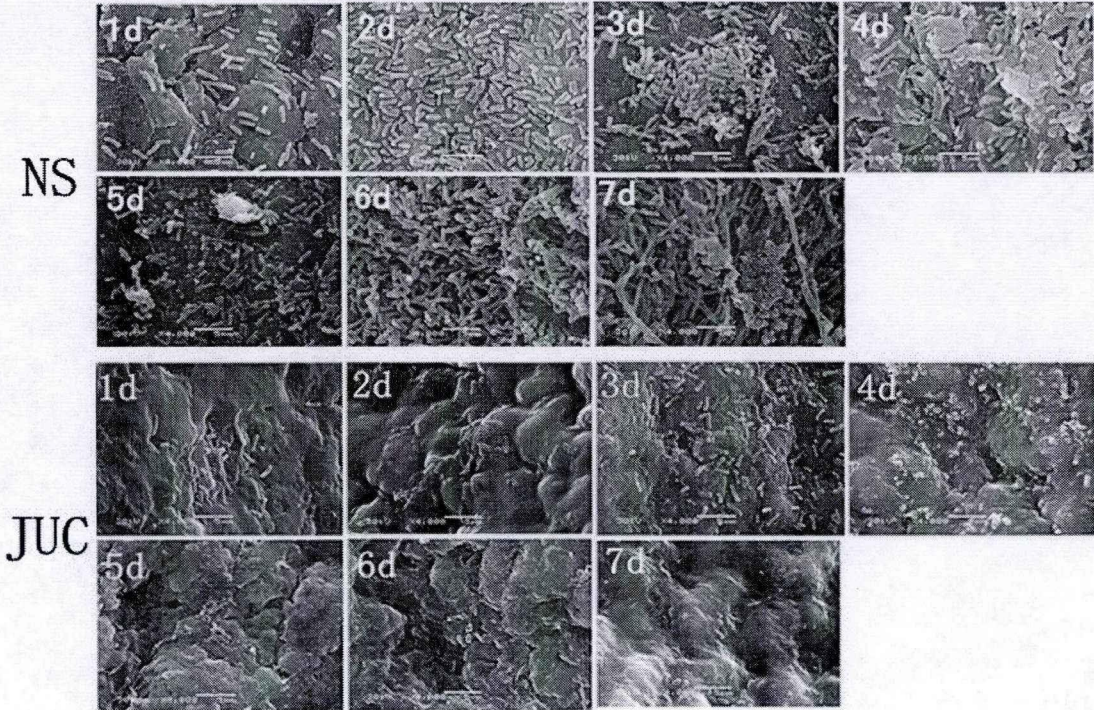


图 10 JUC 对导尿管表面已形成 BF 的杀伤作用

### 2.3.8 JUC 对 BF 的杀伤机制

① JUC 可使导尿管表面逐渐光滑（见图 11）

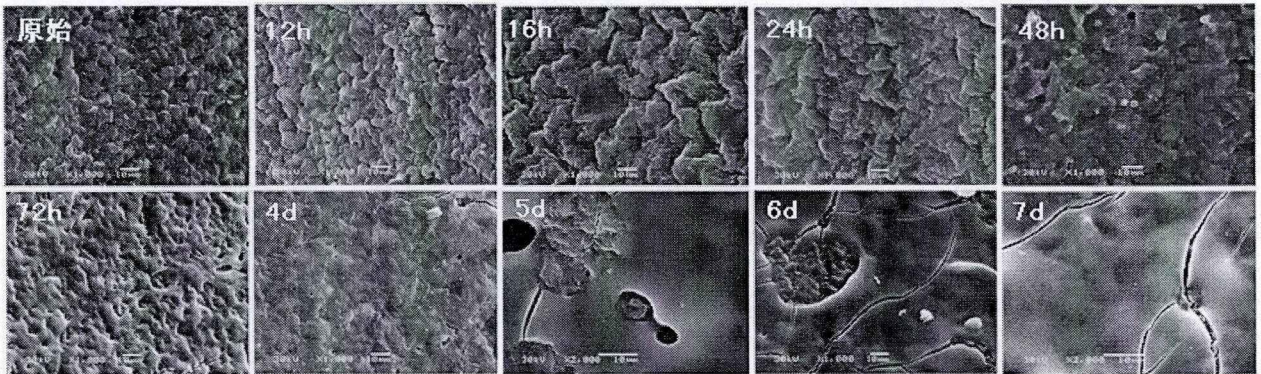


图 11 JUC 可使导尿管表面逐渐光滑

② JUC 可使细菌变形、破裂、溶解（见图 12）

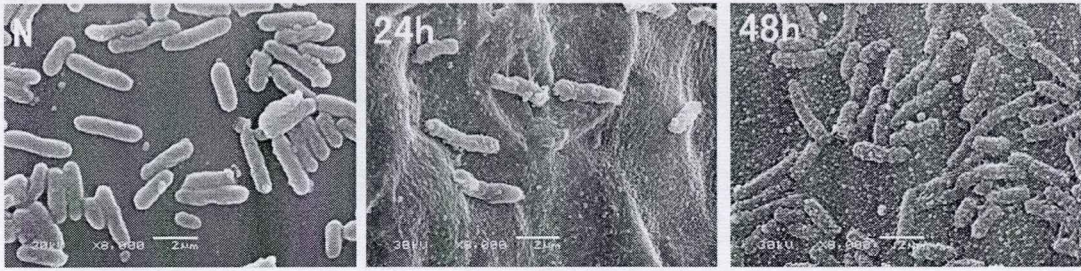


图 12JUC 可使细菌变形、破裂、溶解

## 第三部分 临床试验

### 3.1 试验对象

#### 3.1.1 研究对象

随机选择 2010 年 6 月至 2011 年 6 月在兰州大学第二医院泌尿外科住院拟行外科手术治疗、术前需留置气囊导尿管 7 天及以上且置入导尿管前终端尿细菌培养为阴性的患者 60 例为研究对象。

#### 3.1.2 纳入标准

(1). 泌尿外科手术预期留置气囊导尿管 7 天及以上的住院患者；植入导尿管前中段尿细菌培养阴性。

(2). 临床诊断为前列腺增生、肾结石、膀胱结石，输尿管结石，肾盂输尿管狭窄，肾结核、肾肿瘤，输尿管肿瘤，膀胱肿瘤，前列腺肿瘤，尿道下裂等患者。

(3). 参加研究的病例需经过病史采集和体检。

#### 3.1.3 排除标准

(1). 80 岁以上者；

(2). 长期使用气囊导尿管、自我间歇导尿管、耻骨上经皮穿刺膀胱造瘘术者；

(3). 有证据证明有尿路感染者；

(4). 全身免疫力低下或长期使用免疫抑制剂者；

(5). 精神不正常者；

(6). 对乳胶、水凝胶、铵盐过敏者。

### 3.2 试验方法

#### 3.2.1 试验分组

(1). 患者在治疗前入选的次序，随机分组，奇数组入选实验组（JUC 组），偶数组入选对照组（NS 组）。

(2). 实验组：留置导尿管前用 JUC 喷洒导管外表面，并用无菌注射器抽取 JUC 冲洗导尿管的内表面，待内外导管表面干燥形成物理抗菌膜后，行导尿管或术后导尿。导尿后在每日常规护理的基础上，再用 JUC 喷洒龟头、尿道口和周围皮

肤粘膜，导尿管与引流管连接处，以及接触的衣裤、被褥，每日3次（早、中、晚各1次），每次喷1ml（10喷），直到导尿管拔除。

(3). 对照组：留置导尿后常规用0.9%NS擦拭护理，每日3次（早、中、晚各1次），直到导尿管拔除。

### 3.2.2 试验方案

(1). 术前采集中段尿<sup>[14] [15]</sup>并进行尿液细菌培养<sup>[16]</sup>，如检验结果为阳性，则排出此病例。

(2). 所有患者根据病种不同且根据需要行手术治疗，术后留置导尿管7天及以上。

(3). 患者术后可根据实际情况考虑是否应用抗生素，如果应用抗生素则需要记录抗生素的名称和给药方法。

(4). 实验组：手术中留置导尿，导尿前用JUC处理导尿管，术后用每日3次用JUC进行尿道口护理，直到导尿管拔除。

(5). 对照组：手术中或术前留置导尿，手术后常规尿道口护理，直到导尿管拔除。

(6). 根据患者病情，选择尿管拔除的时间，于留置的第7天（不足7天为拔管前，例如第3天，第5天）在严格无菌操作下采集尿液并作尿液的细菌培养<sup>[16]</sup>及尿常规检验，如留置时间大于7天，则在拔管前（例如第10天，第12天或第15天）留取尿液作细菌培养。

(7). 按意向处理原则进行7天的观察。主要终点是植入导管后7天内明显菌尿症的发生率。明显菌尿症的定义为每毫升尿液含菌落形成单位（CFU）大于 $10^3$ CFU/ml<sup>[32]</sup>。

## 3.3 统计学方法

研究结果采用 $\chi^2$ 检验进行差异显著性分析，应用SPSS14.0统计软件包进行。

## 3.4 试验结果

表 5 留置导尿 7 天菌尿发生率及细菌分布

分组	总例数 (60 例)	中段尿细菌培养 阳性例数 (例)	菌尿率* (%)	细菌分布 (例)			
				大肠杆菌	粪肠球菌	阴沟肠杆菌	真菌
JUC 组	30	1*	3.3	1	0	0	0
NS 组	30	8	26.7	4	2	1	1

\*P<0.05, 60 例患者均未出现与 JUC 相关的不良反应

## 第四部分 讨论

### 4.1 BF 形成机制及 CAUTI 感染途径的讨论

细菌生物膜是由细菌及其分泌的胞外脂多糖（含水聚合性基质）等物质所组成的多细菌膜样复合体。是一种特殊的、区别于浮游细菌的生长方式，游离细菌为了适应复杂的生存环境，在其生长过程中逐渐粘附于生物材料表面，从而形成细菌生物膜<sup>[33]</sup>，细菌被大量的胞外多糖包绕形成微菌落，各微菌落之间充满水通道，是细菌获取营养和排除代谢废物的通道。随着微菌落增多、BF 增厚，被包裹在 BF 内的细菌获取外界营养物质减少，增值减慢，甚至死亡，BF 发生崩解，细菌从生物膜上脱落（见附图 1）。细菌鞭毛、菌毛在细菌的转移定植中起到了关键的作用，随着细菌鞭毛的运动，从成熟 BF 上脱落的游离细菌可转移到其他部位并迅速定植，BF 的这种反复循环的特殊生长方式，导致感染逐渐加重（见附图 2）。

游离细菌主要经过以下六个阶段在导尿管表面形成 BF<sup>[14]</sup>。第一阶段：细菌粘附。首先，环境中的营养信号被游离细菌识别并获取，细菌具有菌毛和鞭毛等特殊附着结构，可通过菌毛或鞭毛活动吸附于导尿管表面并生长、分裂、繁殖。

第二阶段：细菌定植。细菌开始在导尿管表面快速增殖，数量急剧增多。第三阶段：细菌聚集、微菌落形成。此时，随着更多游离细菌的不断粘附和定植，致使该粘附位点的细菌过度拥挤，细菌的生长环境遭到破坏，甚至恶化，细菌摄取的营养物质不足、有毒代谢产物积聚。于是，许多缺乏营养的细菌开启了胞间信号系统，并释放胞间信号。第四阶段：初步形成细菌生物膜。此阶段的 BF 不够稳定、易被洗脱。第五阶段：成熟 BF 形成。随着细菌的不断粘附、聚集及微菌落的形成，细菌通过胞间信号系统的控制与调节，在导尿管表面轻轻移动并分泌胞外多糖，逐渐形成团块状或蘑菇样的亚单位结构，多个亚单位结构融合，最终形成复杂交错的，具有三维立体结构的稳固的成熟 BF（见附图 3：本实验中所获得图像）。BF 外层细菌产生的分泌物对 BF 内细菌起到保护作用，导致抗生素难以穿透 BF，无法起到抑菌或杀菌的作用。在这种 BF 的保护下，即使在恶劣的条件下细菌也能很好的生存，此时的 BF 致病能力最强，成为医院感染的重要因素。第六阶段：细菌 BF 崩解、细菌从 BF 上游离出来。当 BF 内环境继续恶化，细菌无法耐受恶劣的生长环境时可分泌胞外水解酶，这种酶可促使胞外多糖发生水解，从而使 BF 内的细菌游离出来。游离细菌继续粘附、定植、聚集、形

成新的生物膜。如此形成游离细菌、BF，游离细菌、BF 的反复循环。由此可见，BF 的形成是一个周而复始、动态演变的过程。

CAUTI的致病途径主要有3种：(1)腔外感染途径：细菌沿导尿管外壁与尿道黏膜之间的BF而上行；(2)腔内感染途径：尿管与尿袋导管相连处污染及尿袋出口处污染；(3)外源性感染途径：即尿道外口易受尿道分泌物、血迹、粪便污染，同时污染的衣裤、被褥均可污染尿道外口周围黏膜和导尿管。相关文献普遍认为腔外感染途径是引起CAUTI的主要形式<sup>[34]</sup>。

## 4.2 引起 CAUTI 细菌种类的讨论

UTI是院内感染发生比例中最大的一类感染，而CAUTI是UTI的重要组成部分<sup>[1, 2]</sup>。同时尿道周围区域存在大量的肠道细菌<sup>[7, 35]</sup>，大多数由短期留置导尿引起的CAUTI是由单种细菌引起的，常见的有大肠杆菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌等，而由多重微生物引起的BF则多见于长期置管的CAUTI患者<sup>[7, 36, 37]</sup>。引起泌尿系统感染的细菌以大肠杆菌最为常见，由其导致的CAUTI占HAI的比率高达50%<sup>[7, 25]</sup>。我国学者喻华，刘华等人对尿路感染病原菌分布进行研究<sup>[38]</sup>，占前几位的细菌依次为大肠埃希菌53.64%，肠球菌属9.27%，凝固酶阴性葡萄球菌7.95%，假单胞菌5.96%，产ESBLs大肠埃希菌的检出率为13.58%，产ESBLs肺炎克雷伯菌的检出率为16.67%，HLAR肠球菌属检出率为57.14%。在本研究的临床试验中，我们也看到类似结果，大肠杆菌的感染占绝对优势55.6%，其次是粪肠球菌，其他细菌有阴沟肠球菌和真菌，都占很小的比例。因此我们选择大肠杆菌和粪肠球菌作为优势菌种进行了相关的体外实验。

## 4.3 CUATI 的防治方法

20多年前，美国CDC就明确提出为了预防CAUTI强调采用手卫生、无菌插管和应用封闭式引流装置的方法<sup>[39, 40]</sup>。近期，美国院内感染联盟（Healthcare-Associated Infections Allied Task Force）对预防CAUTI提出了纲要，包括对感染的监察，加强预防CAUTI的教育和训练，采用适当的插入技术，取代留置尿管的方法（如避孕套和间歇导尿），即时移除导尿管等等<sup>[39, 41, 42]</sup>。由WHO发布的相关文件中明确指出：以下措施对预防CAUTI无效，如抗生素全身预防性用药、抗生素膀胱灌注、生理盐水膀胱冲洗，定时消毒引流管连接处、更换引流袋等措施<sup>[1]</sup>。近年来随着抗菌药物在临床的广泛应用，从临床致病菌中分离出的耐药菌株越来越多，细菌多重耐药的情况也很严重。目前，已有超广谱

$\beta$ -内酰胺酶引起医院感染暴发流行的国外报道。相关研究证明,对于预防 CAUTI 的各种护理措施而言,不管是使用肥皂水、生理盐水、皮肤清洁剂还是聚维酮碘,这些会阴护理方法并没有对 CAUTI 的发生率产生明显的影响<sup>[43]</sup>用抗菌药物进行膀胱冲洗或使用抗菌引流袋只能在短时间内抑制菌尿症的发生<sup>[13]</sup>。而对于导管应用的材料来说,单一生物表面,包括硅,聚亚胺酯,合成的生物材料,或者表面覆盖水凝胶的材料等,没有一种在预防细菌定植上更有效果<sup>[3, 15]</sup>。

#### 4.4 不同导尿管材质与 CAUTI 的关系

目前,在我国医院临床治疗中使用的导尿管材质主要有四类:第一种是硅化乳胶导尿管,我们通常称之为乳胶导尿管,即将一层硅橡胶包被在乳胶导尿管表面,这种方法可减少由于乳胶材料组织相容性差而对尿道粘膜造成的刺激和不适感。此类导尿管具有价位适中,因此在我国医院广泛使用;第二种是橡胶导尿管,这种材质的导尿管虽价格低廉,但对尿道粘膜有很大的刺激性,且容易引起泌尿系统的感染,现已基本淘汰;第三种是PVC塑胶一次性导尿管,这种一次性导尿管虽然表面光滑、价格便宜,但质地坚硬、生物相容性差,只用于急性尿潴留患者一次性导尿时使用。第四种是硅橡胶导尿管,即我们常说的硅胶导尿管。硅橡胶导尿管的特点是组织相容性好,尿道分泌物和沉积物不易在尿管表面粘附,且导尿管表面光滑、弹性好,能够较好的保持引流的畅通性,能减少患者置管的不适感,更容易被患者接受。但其价格昂贵,在我国虽有生产但使用率不高。

在本研究中我们发现,电镜 2000 倍视野下,橡胶导尿管表面凹凸不平、有裂隙;乳胶导尿管表面粗糙、无裂隙;塑胶、硅胶导尿管表面光滑。经大肠杆菌培养的橡胶、乳胶导尿管 24h 便可形成成熟的 BF;虽然塑胶导尿管表面光滑,但由于其质地硬、生物相容性不好,在 48h 也形成了成熟 BF。而硅胶导尿管 7d 后形成成熟的 BF。由此可见硅胶导尿管对导尿管 BF 的形成有一定的抑制作用,可将 BF 形成的时间推迟 1 周,不易引起导尿管伴随性尿路感染。综合导尿管材料的抗菌能力和生物相容性,导尿时应优先选择硅胶导尿管,其次是乳胶导尿管。

#### 4.5 JUC 抗菌效果及机制讨论

大量研究表明 BF 阻碍了抗生素对细菌的作用,才导致 CAUTI 难治<sup>[13]</sup>。而针对生物膜的方法,才是最有效的方法,也是人们研究的热点。针对如何解决 BF 的问题,本研究采用了一种创新的物理方法,这是一种新型的抗微生物膜,试验中在肉眼的条件下无法看到,但在扫描电镜下为灰白色膜状结构,其有效成

分为有机硅季铵盐，呈正电荷，能够杀灭细菌、真菌、病毒等带负电荷的病原微生物，其杀菌机制是通过静电力作用强力吸附细菌，导致细菌破裂、溶解，采用物理的方法，不会产生耐药性<sup>[44]</sup>。

在本研究的体外实验中，扫描电镜下观察可见，经大肠杆菌培养7天的对照组导尿管表面已形成多层成熟的BF；而实验组导尿管表面有JUC抗菌膜结构形成，未见细菌粘附。实验组乳胶导尿管表面细菌粘附、定植、聚集、初步成膜、形成成熟BF的时间较对照组均明显推迟。将JUC喷洒于乳胶导尿管表面，可使导尿管表面逐渐平滑，不利于细菌的粘附和定植；JUC通过物理吸附作用可使大肠杆菌变形、破裂、溶解，从而起到杀菌作用。同时JUC对粪肠球菌也有杀伤作用。CLSM观察可见，经大肠杆菌培养7d的实验组导尿管表面多糖与活菌面积、活菌比例明显少于对照组。对照组在培养16h已有细菌大量聚集形成微菌落，开始形成初级生物膜，第7d时导尿管表面已形成成熟的BF，而实验组即使在第7d也未有明显的细菌粘附，这说明JUC形成的物理抗菌膜在7天内能有效阻止BF的形成。因此我们延长了JUC组标本的观察时间，发现使用JUC后，将导尿管表面BF形成的时间延长到第18d。由此可见使用JUC可将BF形成的时间推迟长达2周以上，且对已形成的BF有一定的杀伤作用，可有效减少CAUTI的感染率。

长期以来，人们从导尿管的材质、置管方法、引流方式、护理措施、抗生素的使用等诸多方面进行研究，以寻找有效预防CAUTI的方法。但长期导尿患者仍将100%发生尿路感染。因此在临床工作中，医务人员要注意手卫生，应严格掌握留置导尿的适应症，减少不必要的插管，需要留置导尿的患者应根据患者病情及预期留置天数选择型号、材质适宜的导尿管，进行留置导尿操作时应严格执行无菌操作，插管动作轻柔，避免损伤患者尿道粘膜，待患者病情好转后应尽早拔除导尿管，防止发生导尿管伴随性尿路感染。

在临床研究中，实验组在留置尿管7天CAUTI的感染率为3.3%，明显低于对照组的26.7%，显示了JUC在临床上7天降低CAUTI的作用，体外试验与临床试验结果一致。

#### 4.6 JUC 最佳用药次数的讨论

合理的用药方式是决定药物治疗效果的关键，在本课题中我们对JUC不同用药次数的抗菌效果进行了对比，发现每8h使用一次JUC即可达到较好的抗菌效果。因此建议在临床使用中，对一般患者的预防性用药可每天使用3次（每8h一次）；对于留置导尿管伴随性尿路感染的高危患者，如老年人、置管时间较长、免疫功能低下等，可根据病情适当增加用药次数至4次每日（每6h一次）

或6次每日（每4h一次），已达到最佳的防治效果。

医务人员在为患者留置导尿前先用 JUC 喷洒导管外表面，并用无菌注射器抽取 JUC 冲洗导尿管的内表面，待内外导管表面干燥形成物理抗菌膜，润滑导尿管后，行无菌导尿术。导尿后嘱患者每天用温开水清洁外阴，再用 JUC 喷洒龟头、尿道口和周围皮肤粘膜，导尿管与引流管连接处，以及接触的衣裤、被褥，每日3次（早、中、晚各1次），每次喷1ml（10喷），直到导尿管拔除。JUC 使用方便，易于掌握，也可用于社区长期留置导尿患者的家庭自我护理。

#### 4.7 试验数据与抗菌药物关系的讨论

国际上手术预防术后感染，一般建议单一的术前用药<sup>[45]</sup>。在多数实际的临床研究中，插尿管的患者都存在使用抗生素预防感染的情况<sup>[3]</sup>，因而现在临床文献中出现的感染率未排除抗菌药物的因素。在美国 Tambyah 等人的 1497 例患者参与的研究中，抗生素平均应用 1.6 天，泌尿外科 CAUTI 总的感染率为 14.9%，其中绝大多数（1165 例）为泌尿外科手术后插管的病人，术后 138 人患 CAUTI，发病时间为术后 6.4 天，其感染率为 11.8%<sup>[5]</sup>。在 Darouiche 的研究中，有 124 人参加了前列腺切除后插管的试验，所有患者在麻醉前都局部注射 1g 头孢唑啉预防感染，接受抗菌药物（米诺环素和利福平联合）涂层的导尿管组在插管第 7 天引起的尿路感染为 15.2%，对照组为 39.7%，而在第 14 天抗菌涂层导管组引起的尿路感染为 58.5%，而对照组为 83.5%<sup>[46]</sup>。

在本次临床试验中，实验组和对照组患者使用抗菌药物的天数均为2~3天，抗菌药物等级相当，具有可比性。

## 结论

1. 引起泌尿系感染的优势菌种依次为大肠杆菌、粪肠球菌。JUC 对大肠杆菌和粪肠球菌均有抑制作用。

2. 大肠杆菌形成 BF 要经过细菌粘附、定植、聚集、初步形成 BF、成熟 BF、崩解六个过程，如此反复循环，形成更稳固的三维立体结构的 BF。大肠杆菌 8h 即可在乳胶导尿管表面粘附，12h 细菌定植，16h 细菌聚集，20h 初步成膜，24h 便可形成成熟的 BF。

3. 使用 JUC 可在导尿管表面形成一层带有正电荷的纳米涂层，使导尿管表面逐渐光滑，不利于细菌的粘附与定植。

4. JUC 可致使细菌变形、破裂、溶解，从而起到抗菌和杀菌作用，有效延长了细菌粘附、定植、聚集、初步成膜、形成成熟 BF 的时间，对预防细菌 BF 的形成效果明显，采用物理方法抗菌，未产生细菌耐药。

5. JUC 对已形成的成熟 BF 也有一定的杀伤作用。

6. 不同导尿管材质对大肠杆菌 BF 的形成也有一定的影响作用。其中硅胶导尿管最不利于 BF 的生长，其次是乳胶和塑胶，橡胶导尿管表面最容易形成 BF。

7. 临床试验进一步证实了 JUC 预防 BF 形成，从而预防 CAUTI 的有效性和安全性。

8. JUC 使用方便、安全、高效、无耐药性，为临床防治 CAUTI 提供了一种新的思路。

## 参考文献

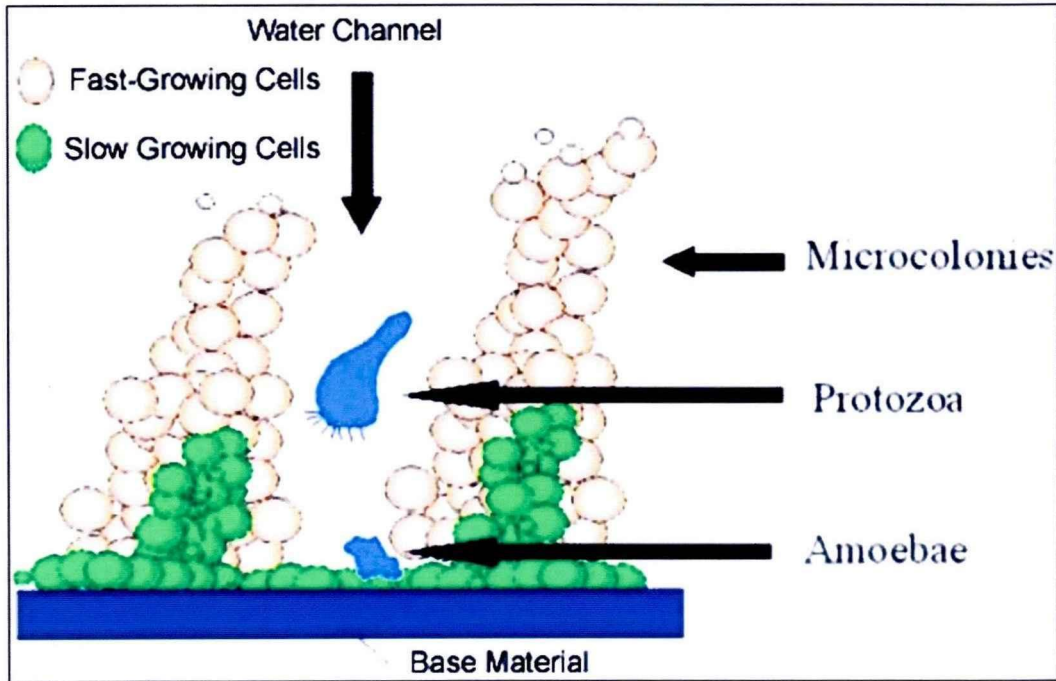
- [1] Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide. 2nd edition 2002, WHO/CDS/CSR/EPH/2002.12 .
- [2] Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG. The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics. *Am J Epidemiol.* 1985. 121(2): 159-67.
- [3] Maki DG, Tambyah PA. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis.* 2001. 7(2): 342-7.
- [4] Johnson JR, Kuskowski MA, Wilt TJ. Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients. *Ann Intern Med.* 2006. 144(2): 116-26.
- [5] Tambyah PA, Maki DG. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: a prospective study of 1,497 catheterized patients. *Arch Intern Med.* 2000. 160(5): 678-82.
- [6] Sorbye LW, Finne-Soveri H, Ljunggren G, Topinkova E, Bernabei R. Indwelling catheter use in home care: elderly, aged 65+, in 11 different countries in Europe. *Age Ageing.* 2005. 34(4): 377-81.
- [7] Trautner BW, Darouiche RO. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch Intern Med.* 2004. 164(8): 842-50.
- [8] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002. 15(2): 167-93.
- [9] Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010. 31(4): 319-26.
- [10] Catheter-Associated Urinary Tract Infection (CAUTI) Event. CDC .March, 2009 .
- [11] Burton E, Gawande PV, Yakandawala N, et al. Antibiofilm activity of GImU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006. 50(5): 1835-40.
- [12] Tambyah PA, Knasinski V, Maki DG. The direct costs of nosocomial catheter-associated urinary tract infection in the era of managed care. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002. 23(1): 27-31.
- [13] Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control.* 2004. 32(3): 177-83.
- [14] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (80- ).* 1999. 284(5418): 1318-22.
- [15] Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001. 7(2): 277-81.
- [16] Schaudinn C, Stoodley P, Kainovic A, O'Keefe T, Costerton B, Robinson D, Baum M, Erlich G, Webster P: Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. *Microbe* 2007, 2:231-237 .
- [17] Flemming HC, Neu TR. Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J*

- Bacteriol. 2007. 189(22): 7945-7.
- [18] Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am.* 1978. 238(1): 86-95.
- [19] Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999. 65(8): 3710-3.
- [20] Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol.* 2002. 19(3): 139-43.
- [21] Johnson JR, Delavari P, Azar M. Activities of a nitrofurazone-containing urinary catheter and a silver hydrogel catheter against multidrug-resistant bacteria characteristic of catheter-associated urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999. 43(12): 2990-5.
- [22] Johnson JR, Berggren T, Conway AJ. Activity of a nitrofurazone matrix urinary catheter against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993. 37(9): 2033-6.
- [23] Tenke P, Kovacs B, Bjerklund JTE, Matsumoto T, Tambyah PA, Naber KG. European and Asian guidelines on management and prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2008. 31 Suppl 1: S68-78.
- [24] Kunin CM. Nosocomial urinary tract infections and the indwelling catheter: what is new and what is true. *Chest.* 2001. 120(1): 10-2.
- [25] Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2008. 21(1): 26-59.
- [26] Stickler DJ, Morris NS, McLean RJ, Fuqua C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Appl Environ Microbiol.* 1998. 64(9): 3486-90.
- [27] Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (80- ).* 1998. 280(5361): 295-8.
- [28] Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. *Escherichia coli* 83972 inhibits catheter adherence by a broad spectrum of uropathogens. *Urology.* 2003. 61(5): 1059-62.
- [29] Trautner BW, Darouiche RO, Hull RA, Hull S, Thornby JI. Pre-inoculation of urinary catheters with *Escherichia coli* 83972 inhibits catheter colonization by *Enterococcus faecalis*. *J Urol.* 2002. 167(1): 375-9.
- [30] Soboh F, Khoury AE, Zamboni AC, Davidson D, Mittelman MW. Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995. 39(6): 1281-6.
- [31] 叶联华, 黄云超, 杨达宽等. 聚氯乙烯材料表面细菌生物膜结构观察. *生物医学工程与临床.* 2007. 11(4): 251-254,封3.
- [32] Saint S, Lipsky BA. Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How. *Arch Intern Med.* 1999. 159(8): 800-8.
- [33] 李建华, 宋丰贵. 细菌生物膜形成与细菌耐药机制研究进展. *中国新药与临床杂志.* 2008. 27(1): 70-74.
- [34] 刘秋玲. 预防留置尿管病人泌尿系感染措施的研究进展. *实用护理杂志.* 1997. (01):

10-12 .

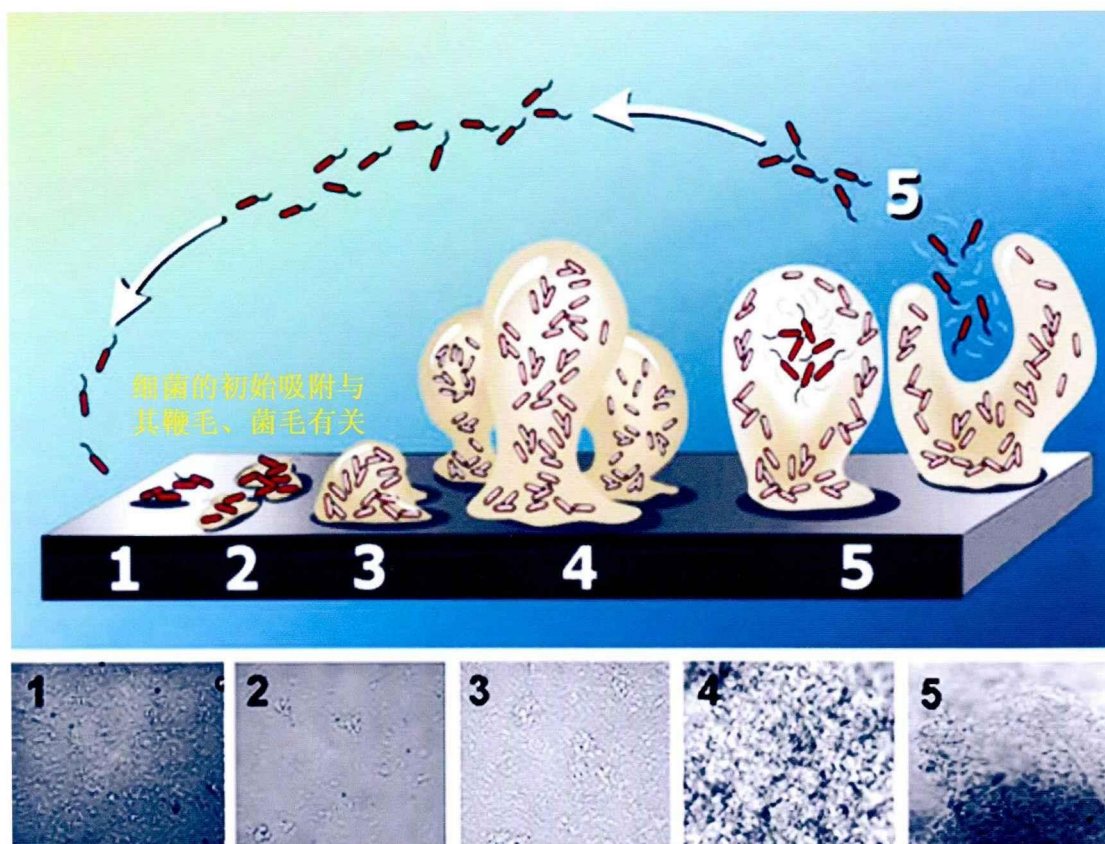
- [35] Saint S, Lipsky BA. Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How. *Arch Intern Med*. 1999. 159(8): 800-8.
- [36] Vejborg RM, Klemm P. Blocking of bacterial biofilm formation by a fish protein coating. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74(11): 3551-8.
- [37] McTaggart LA, Rigby RC, Elliott TS. The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *S. epidermidis*. *J Med Microbiol*. 1990. 32(2): 135-41.
- [38] 喻华, 刘华, 颜英俊, 周忠华, 传良敏. 尿路感染病原菌分布及耐药性检测. *中华医院感染学杂志*. 2003. 13(10): 982-984.
- [39] Saint S, Meddings JA, Calfee D, Kowalski CP, Krein SL. Catheter-associated urinary tract infection and the Medicare rule changes. *Ann Intern Med*. 2009. 150(12): 877-84.
- [40] Wong ES. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Am J Infect Control*. 1983. 11(1): 28-36.
- [41] Yokoe DS, Mermel LA, Anderson DJ, et al. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008. 29 Suppl 1: S12-21.
- [42] Lo E, Nicolle L, Classen D, et al. Strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008. 29 Suppl 1: S41-50.
- [43] Jeong, I.; Park, S.; Jeong, J.S.; Kim, D.S, et al. Comparison of Catheter-associated Urinary Tract Infection Rates by Perineal Care Agents in Intensive Care Units. *Asian Nursing Research* 2010;4(3):142–150 .
- [44] Yizhou Zeng, Runzhi Deng, Barry, et al. Application of an antibacterial dressing spray in the prevention of post-operative infection in oral cancer patients: A phase 1 clinical trial[J], *African Journal of Biotechnology*, 2008, 5 vol.7(21):3827-3831 .
- [45] Antibiotic Action Group Aintree Hospitals NHS Trust , Aintree University Hospitals NHS Foundation Trust And The Walton Centre , Guidelines For Antimicrobial Therapy (Eighth Edition) , September 2007 .
- [46] Darouiche RO, Smith JA Jr, Hanna H, et al. Efficacy of antimicrobial-impregnated bladder catheters in reducing catheter-associated bacteriuria: a prospective, randomized, multicenter clinical trial. *Urology*. 1999. 54(6): 976-81.

## 附图



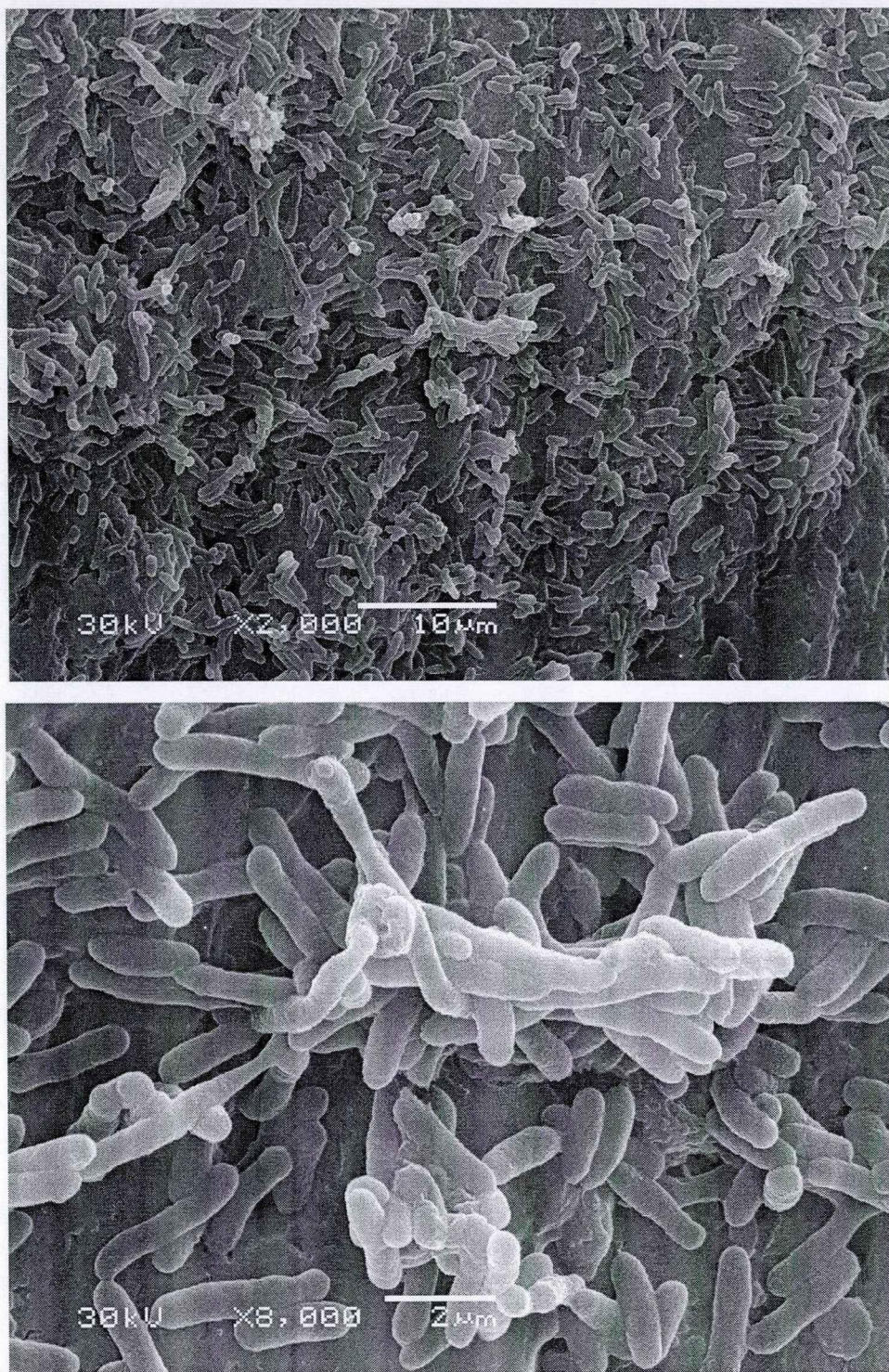
附图 1: BF 营养代谢途径示意图

图示：细菌被大量的胞外多糖包绕形成微菌落，各微菌落之间充满水通道,是细菌获取营养和排除代谢废物的通道。随着微菌落增多、细菌生物膜增厚，被包裹在细菌生物膜内的细菌获取外界营养物质减少，增值减慢，甚至死亡。



附图 2： BF 的形成过程示意图

图示：细菌鞭毛、菌毛在细菌的转移定植中起到了关键的作用，随着细菌鞭毛的运动，从成熟细菌生物膜上脱落的游离细菌可转移到其他部位并迅速定植，细菌生物膜的这种特殊的反复循环的生长方式，导致感染逐步加重，难以控制。



附图 3： 成熟细菌生物膜的三维立体结构电镜形态

图示：具有三维立体结构的成熟、复杂、稳固的蘑菇状细菌生物膜。

## 综述

# 细菌生物膜与留置导尿伴随性尿路感染相关性研究进展

王东敏 王志平

兰州大学第二医院泌尿二科&兰州大学第二医院泌尿外科研究所&甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室  
&甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心, 甘肃兰州 730030

**摘要** 细菌生物膜是导致留置导尿伴随性尿路感染的关键因素。本文通过对导尿管表面细菌生物膜的概念、发病机制、形成过程、致病途径, 导尿管表面生物膜细菌分布特点、耐药机制, 导尿管表面细菌生物膜与留置导尿伴随性尿路感染的相关性以及防治方法等方面进行综述, 便于临床更好的预防导尿管表面细菌生物膜的发生, 从而减少留置导尿伴随性尿路感染的患病率。

**关键词** 生物膜 留置导尿伴随性尿路感染 导尿管

**Research Progress on Correlation with Bacterial Biofilms and Catheter-Associated Urinary Tract Infection.** Dongmin Wang, Zhiping Wang. The Second Hospital of Lanzhou University & Institute of Urology, The Second Hospital of Lanzhou University & Key Laboratory of Urological Diseases in Gansu Province & Gansu Nephro-Urological Clinical Center. Lanzhou.GanSu.730030

**Abstract** The key factor is bacterial biofilms lead to catheter-associated urinary tract infection. In this paper, the concept of bacteria biofilms on the catheter surface, pathogenesis, formation process and pathogenic ways, bacteria distribution characteristics, mechanisms of resistance, correlation with indwelling catheter-associated urinary tract infection and prevention methods were reviewed. Provided for the clinical better to prevention of the bacterial biofilms on catheter surface, accordingly, to reduce the prevalence of catheter-associated urinary tract infection.

**Keyword** Biofilms ; catheter-associated urinary tract infection; catheter

留置导尿伴随性尿路感染(catheter-associated urinary tract infection, CAUTI), 是指由于留置导尿管而引起的泌尿道的感染, 是常见的留置导尿并发症。然而在临床上, 留置导尿仍然是解决排尿困难、尿潴留以及术后引流尿液、冲洗液的主要手段。根据流行病学调查, 在进行导尿或尿路机械操作后, 约有20%-60%的患者可发生尿路感染<sup>[1]</sup>。导尿管引发泌尿系

统感染发生率为90%以上, 约占院内感染的40%<sup>[2]</sup>, 居医院感染的第2位<sup>[3-5]</sup>。研究表明CAUTI的发展和导尿管留置天数有关, 不管是开放式留置导尿还是闭合式留置导尿, 一周内的短期置管可导致的CAUTI几率为10~50%, 且随着留置导尿管天数的增长, CAUTI感染率每天增加3-10%, 约30天后可达到100%<sup>[6, 7]</sup>。CAUTI可导致持续性菌尿, 是引发严重肾盂肾炎和G<sup>-</sup>菌败血症的高危因素<sup>[8]</sup>。在美国CAUTI使患者的平均住院时间增加2.4到4.5天<sup>[9]</sup>, 增加的平均费用为3803美元<sup>[10]</sup>, 甚至导致病死率增加25%-60%<sup>[11]</sup>。对于CUATI的发病机制, 细菌生物膜的原理已被普遍认同, 导尿管表面细菌生物膜(urinary catheters bacterial biofilm, UC-BF)的形成, 是CAUTI发生的主要机制之一。为了有效预防BF的形成, 减少CUATI的发生率, 本文将针对UC-BF的形成过程、UC-BF与CAUTI的关系、细菌分布特征、耐药机制及其防治、护理措施等方面作如下综述。

## 1. UC-BF

### 1.1 UC-BF的概念及发病机制

细菌生物膜(bacterial biofilm, BF) 是由细菌及其分泌的胞外脂多糖等物质组成的多细菌膜样复合体。是一种区别于游离细菌的特殊生长方式, 游离细菌为了适应生长环境, 在其生长的过程中逐步粘附于生物材料表面从而形成BF<sup>[12]</sup>。由于留置导尿而在导尿管表面形成的细菌生物膜则称为UC-BF。BF的形成显著增强了生物膜内细菌对抗生素、化学杀菌剂以及人体免疫系统的抵抗能力, 很难将其彻底杀灭, 从而可导致反复发作的难治性感染的发生。

### 1.2 UC-BF形成过程

研究发现, UC-BF 的形成过程主要包括以下 6 个阶段<sup>[13]</sup>: 第一阶段: 细菌粘附。首先, 环境中的营养信号被游离细菌识别并获取, 细菌具有菌毛和鞭毛等特殊附着结构, 可通过菌毛或鞭毛活动吸附于导尿管表面并生长、分裂、繁殖。第二阶段: 细菌定植。细菌开始在导尿管表面快速增殖, 数量急剧增多。第三阶段: 细菌聚集、微菌落形成:。此时, 随着更多游离细菌的不断粘附和定植, 致使该粘附位点的细菌过度拥挤, 细菌的生长环境遭到破坏, 甚至恶化, 细菌摄取的营养物质不足、有毒代谢产物积聚。于是, 许多缺乏营养的细菌开启了胞间信号系统, 并释放胞间信号。第四阶段: 初步形成细菌生物膜。此阶段的 BF 不够稳定、易被洗脱。第五阶段: 成熟 BF 形成。随着细菌的不断粘附、聚集及微菌落的形成, 细菌通过胞间信号系统的控制与调节, 在导尿管表面轻轻移动并分泌胞外多糖, 逐渐形成团块状或蘑菇样的亚单位结构, 多个亚单位结构融合, 最终形成复杂交错的, 具有三维立体结构的稳固的成熟 BF (见附图 3: 本实验中所得图像)。BF 外层细菌产生的分泌物对 BF 内细菌起到保护作用, 导致抗生素难以穿透 BF, 无法起到抑菌或杀菌的作用。在这种 BF 的保护下, 即使在恶劣的条件下细菌也能很好的生存, 此时的 BF 致病能力最强, 成为医院感染的重要

因素。第六阶段：细菌 BF 崩解、细菌从 BF 上游离出来。当 BF 内环境继续恶化，细菌无法耐受恶劣的生长环境时可分泌胞外水解酶，这种酶可促使胞外多糖发生水解，从而使 BF 内的细菌游离出来。游离细菌继续粘附、定植、聚集、形成新的生物膜。如此形成游离细菌、BF，游离细菌、BF 的反复循环。由此可见，BF 的形成是一个周而复始、动态演变的过程。

### 1.3 UC-BF的致病途径

CAUTI的致病途径主要有3种：(1)腔外感染途径：细菌沿导尿管外壁与尿道黏膜之间的细菌生物膜而上行；(2)腔内感染途径：尿管与尿袋导管相连处污染及尿袋出口处污染；(3)外源性感染途径：即尿道外口易受尿道分泌物、血迹、粪便污染，同时污染的衣裤、被褥均可污染尿道外口周围黏膜和导尿管。相关文献普遍认为腔外感染途径是引起CAUTI的主要形式<sup>[14]</sup>。

### 1.4 UC-BF细菌分布特征

BF相关感染的复杂性、多样性及细菌分布特征，是由BF所具有的复杂结构所决定的。就理论而言，在留置导尿管表面粘附、定植的细菌可能来源于以下几种途径：(1)由于留置导尿可致尿道黏膜机械性损伤，对细菌的防御能力下降，肛周、外生殖器的正常菌群以及与病人接触的衣裤、被褥都可能成为感染源；(2)非严格无菌的留置导尿操作和尿道护理将细菌带入；(3)集尿袋倒置或高于耻骨联合水平，使尿液反流引起感染；(4)手卫生不严格可引起交叉感染。叶绪富等<sup>[15]</sup>对2704份尿培养标本及其分离出的病原菌进行鉴定和药物敏感试验，结果共分离出泌尿系感染菌株758株，以大肠埃希菌为主，占41.16%；其次为粪肠球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌等。赵艳梅<sup>[16]</sup>收集200例尿路感染病人，尿培养分离出236株病原菌，其中革兰阴性杆菌177株，革兰阳性球菌59株；分离数排在前5位的病原菌为：大肠埃希氏菌(60.6%)、肠球菌(17.4%)、凝固酶阴性葡萄球菌(10.2%)、铜绿假单胞菌(9.4%)、阴沟肠杆菌(2.4%)。

### 1.5 UC-BF的耐药机制

留置导尿管表面形成的细菌生物膜结构，可以使微生物对抗生素、杀菌剂和消毒剂产生耐药<sup>[17]</sup>。与普通细菌相比，生长在BF内的细菌，其理化性质、结构功能、形态特点以及对抗生素及化学杀菌剂的敏感性等都明显不同<sup>[18]</sup>。BF由外向内含有的营养成分逐渐减少。BF外层细菌的代谢、增殖、分化和对抗菌药物的敏感性与浮游细菌相似，这是因为外层细菌可从外界摄取到足够的氧气和营养物质，而BF内细菌由于被脂多糖层层包裹，很难从外界获取充足的氧气和营养物质，所以细菌分裂缓慢，处于相对的休眠状态，对化学杀菌剂、抗生素、以及人体免疫系统的耐受性显著增加<sup>[18]</sup>。所以，存在于BF内的细菌对抗生素的耐药性是浮游细菌的10~1000倍<sup>[19]</sup>。BF的耐药机制主要有以下几个方面<sup>[20, 21]</sup>：(1)生物膜产生屏障作用，胞外多糖、胞外基质等由细菌合成的特殊物质可是细菌粘附、聚集，形成稳定的、特

殊的团块状或蘑菇状三维立体结构,这是有效阻碍抗生素向BF内细菌渗透的天然屏障。(2)BF内细菌由于缺氧、营养不足,毒性代谢产物积聚而生长变慢,甚至停止分裂,使细菌处于休眠状态,降低了其对抗生素的敏感性。(3)与浮游细菌不同的是,生物膜细菌表面可以释放出一种特异性蛋白产物,它能够形成生物膜细菌的特异性表型,使其产生耐药。(4)抗菌药物、尿道口护理不能到达与尿管接触的所有部位。近年来,由于抗生素的不合理使用,各类菌属对常用抗生素具有较高的耐药性,尿路病原菌对抗菌药物的耐药率也一直不断增长,从CAUTI病例中分离的约1/4的大肠杆菌和1/3的绿脓杆菌都是耐药的<sup>[7]</sup>。同时,泌尿系统真菌感染的比率呈明显上升的趋势。王君<sup>[22]</sup>等从622份患者尿标本中分离出阳性标本297株,病原菌主要为大肠埃希氏菌,其次为肠球菌,再次为真菌。大肠埃希氏菌163株,占总数的54.88%,ESBLs阳性菌株86株,阳性率为52.76%。

## 2. UC-BF与CAUTI的相关性

### 2.1 UC-BF致CAUTI的机制

由于细菌沿留置导尿管外壁与尿道黏膜之间的细菌生物膜上行是引起CAUTI的主要致病途径<sup>[14]</sup>,留置导尿属于有创操作,导尿管对人体尿道及膀胱黏膜而言是异物,植入时极可能致其机械性损伤,从而对正常泌尿系统发的生理环境造成损伤,削弱其对病原微生物的抵抗作用,影响尿液对细菌的正常冲刷作用,为细菌入侵创造条件,从而更易导致CAUTI的发生。

### 2.2 CAUTI的防治措施

导尿管表面形成成熟的BF是CAUTI发生的重要因素。BF特殊的理化性质,使BF内的细菌受到很好的保护作用,使其既能逃避抗菌药物的杀伤作用,又免于人体免疫机制的吞噬作用。因此探讨如何防治UC-BF相关感染已成为国内外众多学者关注和研究的课题。目前除在临床留置导尿操作中严格执行无菌操作外,操作者置管时应做到动作轻柔,防止对尿道黏膜造成机械性损害。同时输患者增加饮水量,根据患者病情及时拔管,缩短留置导尿的天数等都能有效预防尿路感染的发生。近年来,关于灭菌药物应用、导尿管材质构成等方面的研究日益增多,其共同的目标就是有效预防BF的形成,从而减少CAUTI的发生率和死亡率。

#### 2.2.1 新型留置导尿管的研发

陶宏平等<sup>[23]</sup>在Foley双腔气囊导尿管的基础上研制了可冲洗尿道的导尿管,冲洗尿道时无菌生理盐水可从导尿管壁与尿道间隙由里向外流出,将尿道分泌的粘液、细菌、坏死脱落物等一起冲出,达到清洗的目的。经这种特殊导尿管进行尿道冲洗后,细菌培养的阳性率明显下降。Schumm等<sup>[24]</sup>应用银合金导尿管明显降低了尿路感染的发生率。Davenport等<sup>[25]</sup>研究发现,银合金导尿管可显著降低尿路感染的发生率,但价格较贵。氧化银涂层的导尿管和经

过银离子浸泡处理的导尿管因不能减少无症状菌尿的发生率而被淘汰。经过氧化钛光催化处理的导尿管,能将钛颗粒附着在导尿管内外管壁。二氧化钛与银离子联合涂层的导尿管比二氧化钛单涂层的导尿管的自洁功能更强,能使CAUTI的发生率显著下降<sup>[26]</sup>。上世纪九十年代研制的表层包裹亲水多聚物的导尿管,在接触水或人体体液时,可引起环氧化合物和多胺化合物产生化学反应,在导尿管表面形成滑润层,能很大程度降低置管、拔管时导尿管对尿道粘膜的摩擦和损伤。然而Stensballe等<sup>[27]</sup>却认为,这种导管在减少置管摩擦力和尿道粘膜损伤效果方面均劣于凝胶润滑导管。Tunney等<sup>[28]</sup>发明了用PVP包裹聚氨基甲酸乙酯导尿管,并证明其滑润程度及亲水性都优于无聚氨基甲酸乙酯包裹的导尿管和硅酮导尿管。Laube等<sup>[29]</sup>通过实验证明,在进行长期导尿管留置时,使用无定形碳涂层的导管可减少CUATI的发生率。

### 2.2.2 抗菌药物使用

抗菌药物通常包括两大类:(1)消毒剂:如聚维酮碘、氯己定等。聚维酮碘由非离子表面活性物质与碘离子络合而成。其对人体皮肤黏膜刺激性较小,对细菌及芽孢有很强的杀伤作用。贺彩芳等<sup>[30]</sup>将两种尿道护理的方法惊醒比较,实验组用聚维酮碘(0.5%)润滑导尿管,并用同种消毒剂护理会阴及尿道口;对照组则用常规的石蜡润滑,用0.1%苯扎溴铵护理会阴及尿道口。结果发现实验组菌尿发生率为12.5%,明显小于对照组的42.5%,由此证明聚维酮碘能显著减少CAUTI的发生。氯己定(洗必泰)和龙胆紫均能有效拮抗酵母菌,且毒性低、价格便宜, Camacho等<sup>[31]</sup>用这类消毒剂对硅胶导尿管表面进行预处理后,显著减少了酵母菌在导管表面的粘附。(2)抗生素:医务人员尝试将抗菌药物(如庆大霉素)配成抗菌润滑剂,以替代石蜡油,既能对导尿管起到润滑作用又能预防CUATI的发生。Stensballe等<sup>[32]</sup>对212例成年创伤患者进行了随机双盲试验,比较被呋喃西林浸泡的硅胶导尿管与普通硅胶导尿管在菌尿发生率上的差异。结果发现实验组菌尿发生率为9.1%,小于对照组的24.7%,且菌尿发生的时间也比对照组迟。Schumm等<sup>[24]</sup>发现导尿管被利福霉素或米诺环素浸泡后可减少1周置管的菌尿发生率。这些研究表明,使用表面涂有消毒剂或抗生素的导尿管可显著降低CAUTI的发生率,其他的一些抗菌方法也有一定的效果,如复方阿米卡星凝胶涂层,但在治疗的同时却有可能加重抗生素的耐药。

综上所述,UC-BF有其特殊的生长方式和致病特点,是引起临床CAUTI的重要机制之一,治疗起来非常困难。随着人们对UC-BF发生机制、发展过程、耐药机制及防治措施的研究正在不断深入,尽管这些方法有一定的前景,但大多仅局限于临床随机观察,尚无确证,还有待进行大样本多中心随机对照研究和基础实验,为预防细菌生物膜的形成,从而防治CAUTI提供可靠的理论依据,增加用药的安全性、规范性和科学性。从而掌握影响UC-BF发生、发展的各种因素,寻找更为有效的治疗手段并应用于临床。除此之外,在临床工作中,医务人员应注意根据CAUTI的致病特点,加强手卫生及无菌操作,减少不必要的插管,缩短留置尿管的时间以及研发新型抗微生物医学材料等措施,以有效预防CAUTI。

## 综述参考文献

- [1] 容桂荣, 郭芸, 唐桂荣. 单向冲洗式气囊导尿管的临床应用与分析. 中华护理杂志. 2003. (10): 16-18.
- [2] Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*. 1989. 42(8): 872-4.
- [3] 杨爱祥, 吴慧娟, 郑贞苍, 杨静, 滕玲. 重症监护病房院内尿路感染临床分析. 中华医院感染学杂志. 2009. (11): 1353-1355.
- [4] 王学荣. 重症监护病房医院尿路感染调查及护理. 华北煤炭医学院学报. 2009. (05): 710-711.
- [5] 范秋香, 张春艳, 蒋雪茹, 孟雪清. 两种更换集尿袋时间与尿路感染关系的探讨. 基层医学论坛. 2006. (14): 654-655.
- [6] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002. 15(2): 167-93.
- [7] Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010. 31(4): 319-26.
- [8] 钱桐荪. 肾脏病学. 2011. 北京. 华夏出版社. 335.
- [9] Burton E, Gawande PV, Yakandawala N, et al. Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006. 50(5): 1835-40.
- [10] Rebmann T, Greene LR. Preventing catheter-associated urinary tract infections: An executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc, Elimination Guide. *Am J Infect Control*. 2010. 38(8): 644-6.
- [11] Mojtahedzadeh M, Panahi Y, Fazeli MR, et al. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in patients admitted with sepsis: etiology, risk factors, and patterns of antimicrobial resistance. *Int J Infect Dis*. 2008. 12(3): 312-8.
- [12] 李建华, 宋丰贵. 细菌生物膜形成与细菌耐药机制研究进展. 中国新药与临床杂志. 2008. (01): 70-74.
- [13] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (80- ). 1999. 284(5418): 1318-22.
- [14] 刘秋玲. 预防留置尿管病人泌尿系感染措施的研究进展. 实用护理杂志. 1997. (01): 10-12.
- [15] 叶绪富, 孔海深. 2704例泌尿系感染者病原菌及耐药性分析. 现代实用医学. 2006. (09): 658-659.
- [16] 赵艳梅. 泌尿系感染病原菌分布及耐药性分析. 医学信息(中旬刊). 2011. (04): 1365-1366.
- [17] Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control*. 2004. 32(3): 177-83.
- [18] Feldman C, Kassel M, Cantrell J, et al. The presence and sequence of endotracheal tube

- colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J*. 1999. 13(3): 546-51.
- [19] Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003. 2(2): 114-22.
- [20] 刘家云, 马越云, 丁振若, 郝晓柯. 细菌生物膜及其临床意义. *中华检验医学杂志*. 2007. (05): 494-497.
- [21] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001. 358(9276): 135-8.
- [22] 王君, 赵棉. 泌尿系感染病原菌分布及耐药性分析. *当代医学*. 2011. (24): 1-2.
- [23] 陶宏平, 程志源, 徐小俊, 潘春武. 可冲洗尿道的导尿管预防留置尿管所致逆行尿路感染的研究. *中华泌尿外科杂志*. 2005. (09): 629-631.
- [24] Schumm K, Lam TB. Types of urethral catheters for management of short-term voiding problems in hospitalised adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008. (2): CD004013.
- [25] Davenport K, Keeley FX. Evidence for the use of silver-alloy-coated urethral catheters. *J Hosp Infect*. 2005. 60(4): 298-303.
- [26] Yao Y, Ohko Y, Sekiguchi Y, Fujishima A, Kubota Y. Self-sterilization using silicone catheters coated with Ag and TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin film. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008. 85(2): 453-60.
- [27] Stensballe J, Looms D, Nielsen PN, Tvede M. Hydrophilic-coated catheters for intermittent catheterisation reduce urethral micro trauma: a prospective, randomised, participant-blinded, crossover study of three different types of catheters. *Eur Urol*. 2005. 48(6): 978-83.
- [28] Tunney MM, Gorman SP. Evaluation of a poly(vinyl pyrrolidone)-coated biomaterial for urological use. *Biomaterials*. 2002. 23(23): 4601-8.
- [29] Laube N, Bradenahl J, Meissner A, V RJ, Kleinen L, Muller SC. [Plasma-deposited carbon coating on urological indwelling catheters: Preventing formation of encrustations and consecutive complications]. *Urologe A*. 2006. 45(9): 1163-4, 1166-9.
- [30] 贺彩芳, 周琦. 脑血管病患者留置尿管致尿路感染相关因素研究. *解放军护理杂志*. 2005. (04): 14-15+27.
- [31] Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TI. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia*. 2007. 163(5): 261-6.
- [32] Stensballe J, Tvede M, Looms D, et al. Infection risk with nitrofurazone-impregnated urinary catheters in trauma patients: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007. 147(5): 285-93.

## 在学期间的研究成果

### 一、发表论文

1. He W, **Wang D**, Ye Z, et al. Application of a nanotechnology antimicrobial spray to prevent lower urinary tract infection: a multicenter urology trial. *J Transl Med.* 2012. 10 Suppl 1: S14.
2. 王东敏, 王永刚, 王志平. 1223 例住院病人健康教育效果评价及分析. *卫生职业教育.* 2012. (16): 114-115.
3. 李红艳, 王东敏. 碘甘油治疗小儿急性化脓性扁桃体炎的疗效观察. *中国美容医学.* 2011. 20(z5): 299.

### 二、参与课题

1. 2010 年参与全国多中心研究 1 项, 项目名称《新型长效物理抗微生物敷料预防留置导尿管伴随性尿路感染的多中心随机对照研究》。
2. 2013 年参与中央高校课题 1 项, 项目名称《抗增殖蛋白 BTG2 在膀胱癌发病和治疗中的作用研究》, 项目编号: lzujbky-2013-134。

## 中英文缩语对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
JUC	Jieyoushen	洁悠神
UTI	urinary tract infection	尿路感染
CAUTI	Catheterassociated urinary tract infection	导尿管伴随性尿路感染
HAI	hospital acquired infections	医院获得性感染
BF	Bacteria Biofilm	细菌生物膜
SEM	scanning electron microscope	扫描电子显微镜
CLSM	Confocal laser scanning microscope	激光扫描共聚焦显微
LPS	Lipopolysaccharides	细菌脂多糖
AO	Human Acrine Orange	吖叮橙
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
PI	Propidium iodide	碘化丙啶

## 致谢

时间过得真快，三年的研究生学习即将结束。回想起三年的求学历程，我感慨颇多，在恩师的教导和帮助下，我成熟了很多，也收获了很多。今天，我就要毕业了，我的心中充满了无限的感激之情。

我想，今天，我之所以能够取得成功，是因为我站在了巨人的肩膀上！

在这里，我衷心的感谢我的导师王志平教授，是您使我找到了自己的人生坐标和前进方向。您一丝不苟的工作态度、严谨求实的科研精神深深的感染了我，能有幸成为您的学生，我感到荣幸和自豪。在此，我向王老师表示我最诚挚的敬意和感谢！

同时，我要感谢陶燕老师、余东立师妹、史晓凤在我实验期间，给我的帮助和支持；感谢泌研所所有老师对我的关爱和指导。感谢王家吉主任、米军师兄在临床实习阶段，对我的严格要求，教会了我许多宝贵的知识和技能。

感谢泌尿外科全体医护人员，感谢所有关心我的老师，也感谢一直以来帮助、支持我的同学和朋友！三年来，我们朝夕相处，共同进步，同窗之谊，我将终生难忘！

是的，今天我能够顺利毕业，登上崭新的人生舞台，需要感谢的人很多！

此刻，我的心情非常激动，我也要感谢我的母校——兰州大学，给了我一个宽阔的学习平台，让我不断吸取新知，充实自己。

最后，感谢我的爱人、家人，在我求学的艰辛道路上给我的支持与鼓励，在我面临困境时，与我风雨同舟，为我排忧解难。你们对我无私的爱与照顾是我不断前进的动力。