

宫内节育器表面的细菌生物膜研究

张向卉, 曲雯雯, 黄薇, 方婕, 吴凡子, 周辛璇

(四川大学华西第二医院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 宫内节育器(IUD)是目前常用的长效避孕措施之一, 然而众多研究认为IUD的应用增加了盆腔炎性疾病(PID)的发生率。近年研究发现细菌生物膜(BF)与感染性疾病的发生息息相关, 本研究拟探究无盆腔炎疾病妇女的不同类型宫内节育器表面是否存在BF, 了解IUD是否为BF形成提供平台, 是否增加盆腔炎性疾病的易感性。方法: 不同类型IUD标本, 根据表面清洁程度分别进行单独电子扫描电镜(SEM)观察, 单独需氧、厌氧细菌培养, 以及SEM观察+培养了解IUD表面是否存在BF。结果: 共纳入IUD标本86例, 85例非PID女性的IUD, 同期1例盆腔感染性疾病患者的IUD。25例进行单独SEM观察, 阳性1例, 其余标本未见典型BF结构。单独细菌培养47例, 需氧细菌培养阳性1例, 见大面积菌苔覆盖, 考虑污染可能性大, 其余标本未见细菌生长。SEM联合培养14例, 细菌培养阳性, 电镜无阳性发现。其余培养及SEM观察阴性。结论: 不论IUD的类型如何, 非PID女性体内的IUD表面无BF存在, 不同与其他体内医疗装置, BF的形成不能成为限制IUD应用的理由。

[关键词] 宫内节育器; 盆腔炎性疾病; 细菌生物膜; SEM

[中图分类号] R715.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2015)06-0021-07

1 前言

宫内节育器(IUD)是目前我国应用最广泛的高效可逆避孕措施^[1], 然而, 自IUD应用以来, 便有学者认为IUD的应用增加女性对盆腔炎性疾病(PID)的易感性, 增加PID的风险^[2]。

正常宫腔通常被认为是无菌的^[3], 既往有研究提示IUD放置过程会使阴道及宫颈的细菌污染子宫内膜^[4, 5]。随着对细菌学及感染性疾病研究的深入, 发现越来越多的感染性疾病, 尤其是慢性及复发性感染性疾病的发生与细菌生物膜(BF)有关, BF是附着在有生命或无生命物体表面的含细菌及自身产生的多聚基质的异质性细胞结构群体, 广泛存在于自然界、人和动物体内。细菌生物膜是相对浮游状态的一种适应性的群体生存形式, 与浮游细菌比较, BF内细菌具有不同的形态结构、生理生化、生

长代谢特点^[6], 而且BF内的微生物极具耐药性。自从Jones等首次将扫描电子显微镜(SEM)用于生物膜样结构(slime layer, 黏液层)的观察^[7], SEM在BF的检测领域应用越来越广泛, 目前SEM是观察BF最直观最常用的方法之一^[8, 9]。

理论上, 若IUD的应用增加PID的风险, 那IUD可能会为细菌形成BF提供粘附及形成界面, 本研究主要应用SEM的观测及细菌培养的方法, 旨在探究非PID女性体内的IUD表面是否存在BF。

2 材料与方法

1) IUD标本。2014年3月至2014年9月在四川大学华西第二医院门诊手术室取出的各种IUD标本, 所有纳入者术前均完成病史采集、妇科查体及实验室检查, 了解其IUD取出原因、婚育史, 有无盆腔痛、不规则阴道出血、白带异常等, 实验室检查主

[收稿日期] 2015-04-29

[基金项目] 宫内节育器表面生物膜及细菌粘附机制(0040215401128)

[作者简介] 张向卉, 1988年出生, 女, 山东庆云县人, 硕士, 主要研究方向为妇科生殖内分泌及计划生育; E-mail: zhxh_l@163.com

要包括经阴道超声、白带常规、血常规、输血免疫等。

本研究已获得四川大学华西第二医院伦理认证委员会批准,所有患者术前均签署知情同意书。

2) 纳入标准。研究组(非PID女性的IUD):取环原因为生育要求,IUD时限已到,更换避孕方式等。

对照组(可疑或确诊PID患者的IUD):参照美国CDC盆腔炎性疾病2010年诊断标准,为性活跃期女性至少有宫颈举痛、子宫压痛或附件区压痛。

3) 排除标准。a.可疑生殖系统恶性肿瘤。b.近3月内使用过抗生素或者抗真菌类药物。c.合并乙肝病毒,人类免疫缺陷病毒等传染性疾病。d.合并有心血管、肝、肾或血液系统等严重疾病者。e.IUD取出过程困难,多次钩取失败。

4) 标本采集。IUD采集严格遵循无菌操作,

IUD取出过程避免接触阴道壁或者体外任何物体及器皿,直接置于IUD运送容器中。

3 实验方法

IUD取出后根据表面清洁程度进行下一步实验,表面清洁或者血迹及组织容易清洗者进行SEM观察(或联合细菌培养),表面附着较多血迹及组织,不宜SEM观察者直接涂板,进行细菌培养。

3.1 SEM观察

IUD标本取出后完整置于缓冲液中清洗。截取长1.5~2.0 cm小段,标本截取部分见图1。2.5%戊二醛中固定,梯度酒精脱水,最后CO₂临界点干燥、离子溅射仪喷金后SEM观察IUD表面有无细菌生物膜存在及细菌生物膜形态。

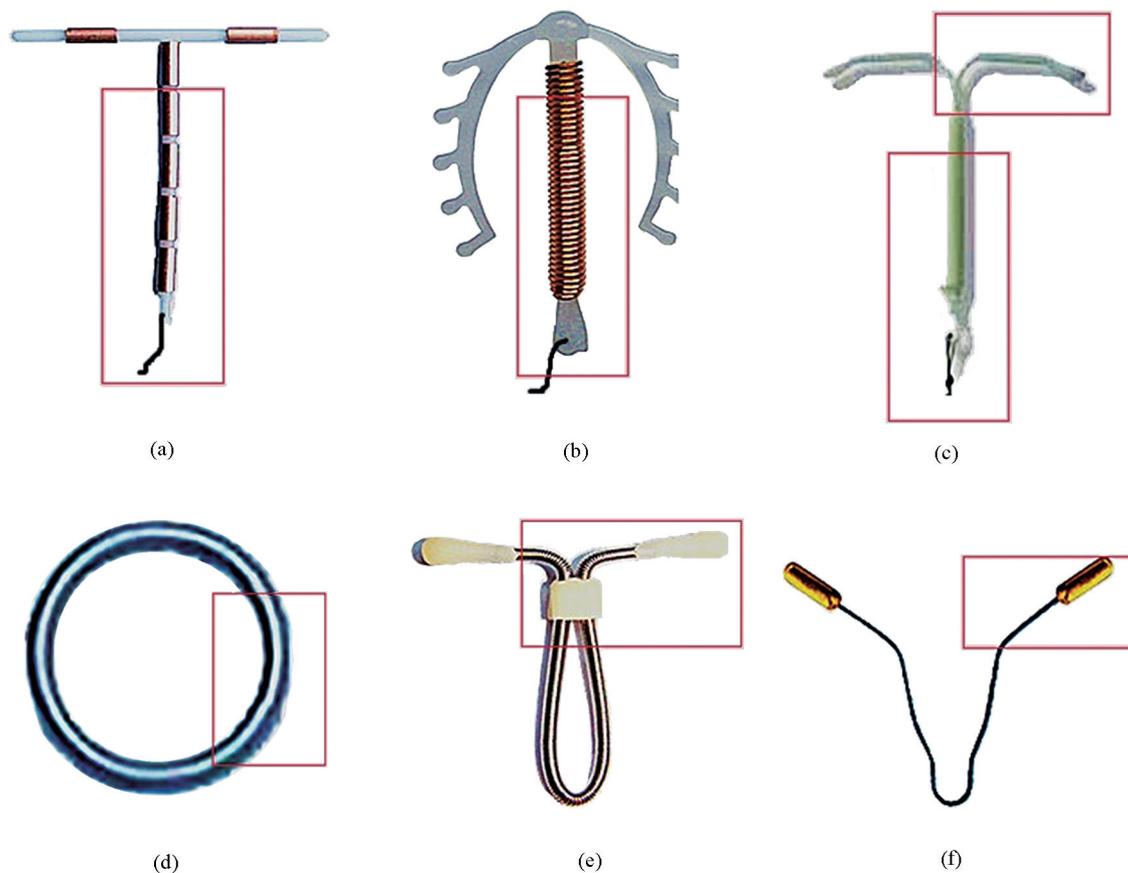


图1 不同类型IUD用于SEM观察的取材部位

Fig. 1 Site of different IUD used for SEM observation

3.2 细菌培养

IUD标本取出后迅速于培养皿中涂板,涂菌棒推涂均匀,对于有尾丝IUD剪除尾丝后再涂布,防止尾丝污染平板。迅速运送回实验室,于专性厌氧,需氧条件下培养24小时。然后观察有无菌落形成、菌落形态,油镜下革兰染色观察微生物形态。

4 结果

4.1 IUD使用者基本情况

共收取IUD标本86例,其中研究组85例,可疑PID 1例,IUD使用者的基本情况见表1。

表1 IUD使用者基本情况

Table 1 Base-line characteristics of IUD users

基本情况	均数±标准差或者例数	范围
年龄(岁)	42.90±9.50	25~78
产次		
4	3	
3	4	
2	17	
1	54	
0	8	
使用年限	10.89±9.06	1月—33年
IUD类型		
不锈钢圆环	46	
TCu IUD	20	
曼月乐	9	
爱母环	6	
母体乐	4	
γ型IUD	1	
IUD取出原因		
阴道不规则出血	35	
自我要求	18	
生育要求	2	
带器妊娠	1	
宫腔术后	5	
疼痛	5	
其他	17	

4.2 SEM观察结果

SEM观察25例,包括不锈钢圆环11例,TCuI-

UD 9例,曼月乐3例,爱母环2例。

一名子宫纵膈术后1月的37岁女性,无腹痛、阴道流血、白带异常等任何不适,妇科查体及B超未见异常,TCu IUD取出后SEM可见细菌生物膜结构,可见短杆状、球状细菌及细胞外基质,主要聚集在铜表面部分,聚乙烯塑料表面未见(见图2)。图2(a)可见IUD的聚乙烯表面有散在颗粒样物质附着,未见细菌生物膜;图2(b)~(d)可见IUD铜表面见短杆状、球状长径0.5~1 μm细菌及胞外基质,簇集分布。其余IUD表面均未见细菌生物膜(见图3)。图3(a)可见不锈钢圆环表面有钙化层及少量细胞大小附着物;图3(b)TCu IUD的聚乙烯、铜及尾丝表面,聚乙烯表面较为光滑,未见明显附着物,铜表面较为粗糙,附着少量白细胞。尾丝表面相对清洁;图3(c)曼月乐的横臂表面粗糙,但未见明显粘附物,纵臂含大量直径10~20 μm含药颗粒,尾丝表面光滑。

4.3 细菌培养结果

培养47例,不锈钢单环31例,T环6例,曼月乐3例,爱母环4例,母体乐3例。其中一名44岁女性,TCu IUD使用10年,因阴道不规则流血要求取出IUD,阴道B超,白带常规等辅助检查及妇科查体未见异常,专性需氧培养可见大量片状菌苔,考虑污染可能性大,见图4。其余IUD细菌培养均为阴性。

5 SEM+培养结果

完成SEM+培养共14例,不锈钢圆环4例,TCu IUD 5例,曼月乐3例,母体乐1例,γ环1例。所有标本SEM均为阴性。

PID 1例,69岁女性,G4P4,不锈钢圆环33年,因下腹疼痛要求取出IUD,无发热、白带异常等其他不适,妇科查体子宫压痛,无双附件压痛及反跳痛,血常规正常。腹部B超未见异常。IUD取出过程中发现宫腔积脓约3~4 mL,光学显微镜下观察考虑葡萄球菌可能性大,SEM表面未见细菌生物膜,见图5。

需氧培养下为白色菌落,呈圆形,凸起,边缘整齐,菌落直径1~2 mm。100倍油镜下革兰染色阳性,细菌呈球状,直径约1 μm,排列成葡萄状,未见鞭毛及芽孢。

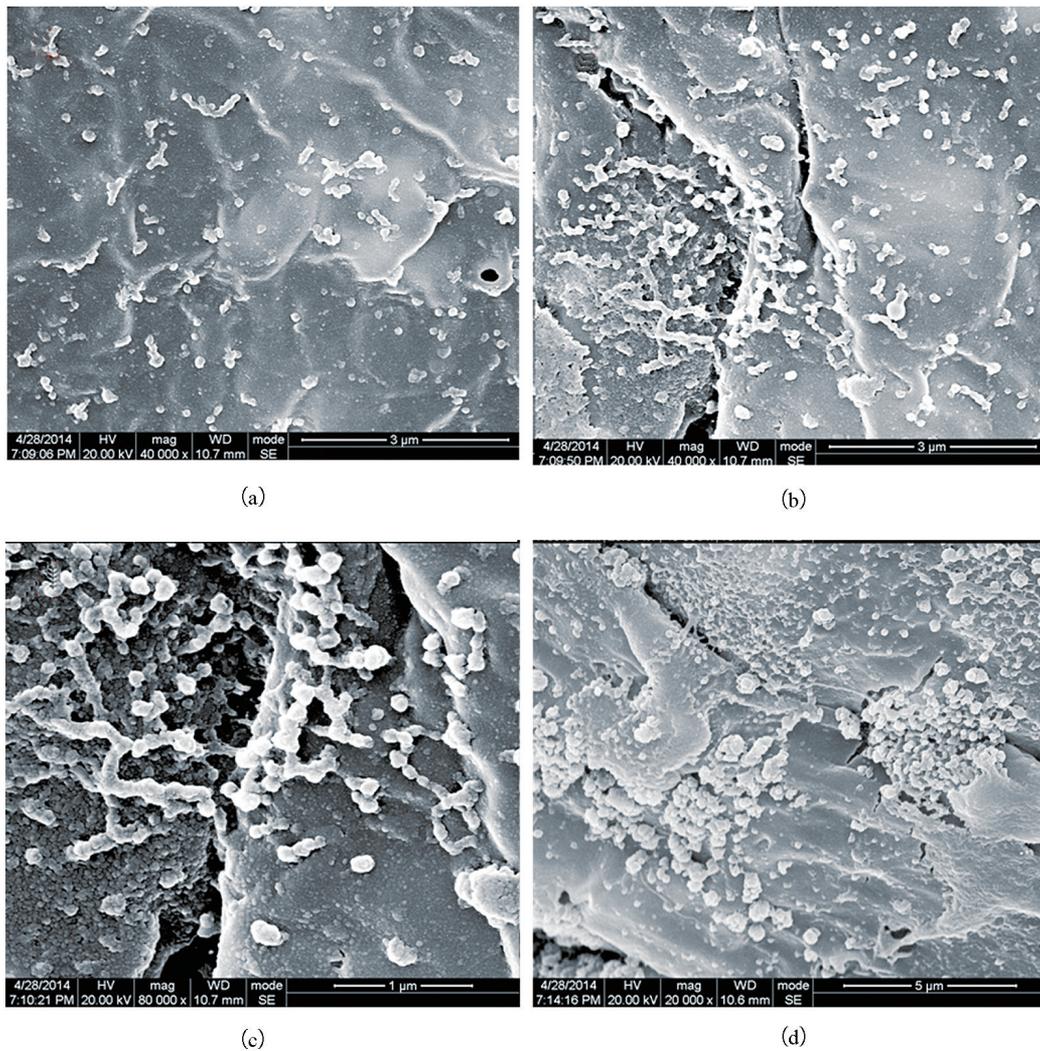


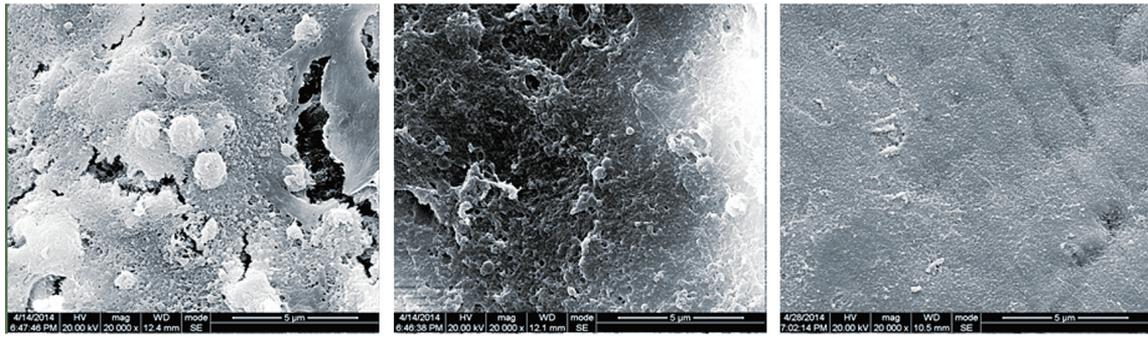
图2 SEM下的TCu IUD表面的细菌生物膜
Fig. 2 BF in the surface of TCu IUD under SEM

6 讨论

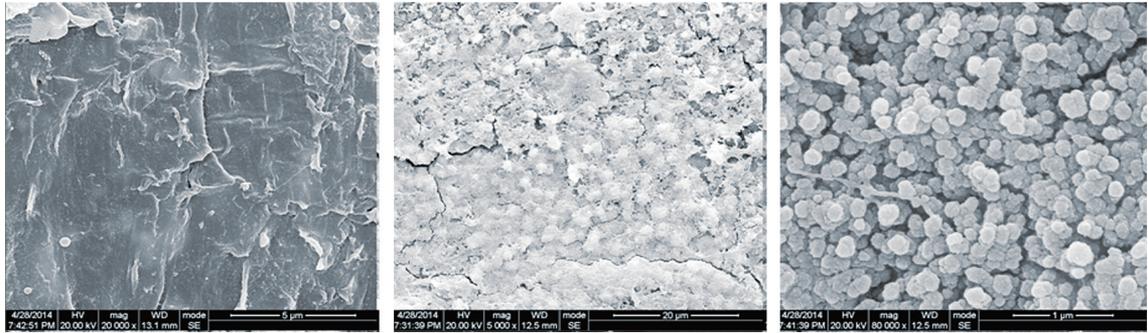
IUD自20世纪30年代应用至今,虽然有着高效可逆的避孕效果,但也被增加PID易感性的阴影所笼罩^[10],这在很多地区限制了IUD的广泛应用。目前为止,尚无可靠的证据表明IUD的应用是否是PID的高危因素。

近年来,医疗装置相关的细菌生物膜在慢性及复发性感染中的作用成为研究热点。现在的研究

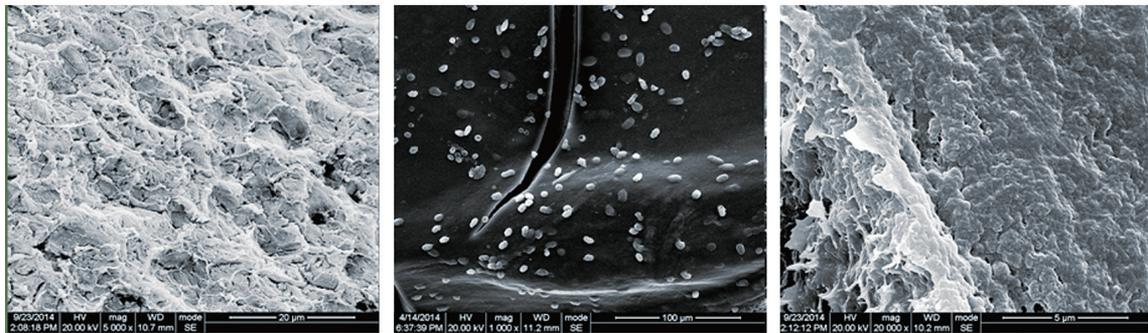
认为,在人体组织中,生物膜中的细菌相比浮游细菌有更强的耐药性,对人体免疫系统更具抵抗力,在自然环境中则可更好的适应环境变化,因此,只要条件允许,大多数细菌会调整生物化学、行为甚至基因特征来形成细菌生物膜^[6]。医用体内装置的使用解决了很多医学难题,但这不可避免的增加了细菌形成BF的风险,相对人体组织,体外医疗材料上更易形成BF^[11]。



(a)



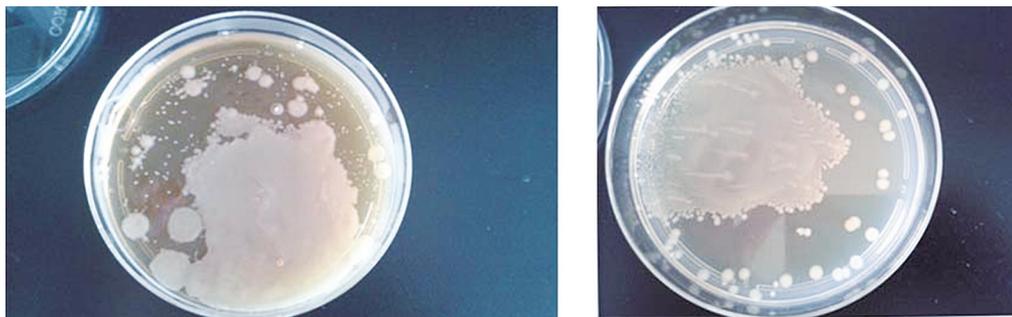
(b)



(c)

图3 不同IUD的SEM下结构

Fig. 3 Characteristic of different IUD under SEM



(a)

(b)

图4 需氧细菌培养菌落形态

Fig. 4 Colony morphology of aerobic bacterial culture

注:需氧细菌培养见菌落呈大面积菌苔状

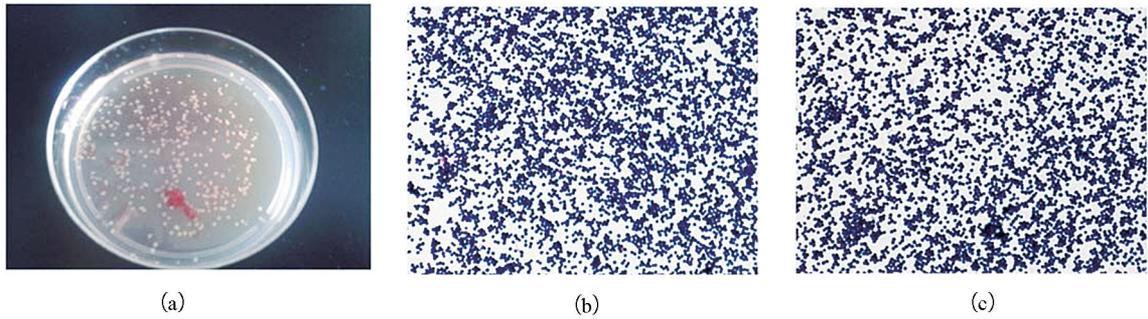


图5 可疑PID患者细菌菌落及镜下形态

Fig. 5 Colony morphology and microscopic characteristics of PID patient

BF相对牢固,IUD取出过程中不易破坏,污染的浮游菌也可在清洗过程中去除,另外,无论细菌的生存状态如何,SEM均可观察到,相对传统的细菌培养,SEM可有力的证实细菌是否存在。理论上,若IUD增加PID的风险,其使用使原本无菌的宫腔受到阴道菌群的污染^[12],那相比每月定时脱落的子宫内膜,细菌更可能会在IUD表面形成BF。笔者的研究并不支持这种假设,完成SEM观察的38例非PID女性中,仅1例IUD表面见BF结构,BF阳性者IUD使用时限较短,仅为1月,患者无PID的临床表现,实验室检查正常,该结果支持早期的一些研究,即对子宫切除术后的IUD直接取出培养,结果显示IUD放置的24小时内阳性率最高,随后逐渐降低,30天后完全消失,可能IUD放置过程中会将宫颈及阴道内的细菌带入宫腔,但随着时间的延续,宫腔内的细菌可完全消除^[5]。但本研究中另有IUD使用1月取出2例并未发现BF,提示BF在非PID女性的IUD表面存在率很低。

鉴于部分IUD标本表面血迹及内膜组织无法清除,不宜采用SEM观察,本研究旨在联合传统的细菌培养证实IUD表面是否存在BF。但是研究中非PID女性IUD细菌培养的阳性率几乎为零。早期学者证实IUD放置的24小时内细菌培养阳性率最高,随后逐渐降低,30天后完全消失^[5]。

受研究时限的限制,本研究中仅纳入一名PID对照者,表现为宫腔积液,IUD取出前未曾接受抗生素治疗,患者年龄较大,无发热及血象改变,细菌培养提示葡萄球菌可能性大,但是SEM观察未见明显细菌生物膜结构,可能与BF内的细菌释放分散有关。

本研究也有不当之处,研究人群平均年龄较

高,为非性活跃期女性,多为经产妇,有稳定的婚姻或者两性关系,是PID的低危人群,一些隐性PID的发生率也低,另外,本研究未对IUD表面是否存在淋病奈瑟菌及沙眼衣原体进行检测,这些可能对研究结果有一定影响。而且,未能纳入足够数量的PID女性,对PID女性体内IUD的研究不够。

综上所述,笔者的研究认为非PID女性体内的IUD表面不存在细菌生物膜,也不会成为PID发生的潜在危险。相比其他体内医疗装置,BF的形成不应该成为限制IUD广泛应用的理由。

参考文献

- [1] 国家人口计生委科技司. 12万例宫内节育器避孕效果调查报告[J]. 中国计划生育学杂志, 2007(3): 132-136.
- [2] Burkman R T. Intrauterine device use and the risk of pelvic inflammatory disease[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1980, 138(7 Pt 2): 861-863.
- [3] Sparks R A, Purrier B G, Watt P J, et al. The bacteriology of the cervix and uterus[J]. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1977, 84(9): 701-704.
- [4] Newton J R, Emens M J, Burdon D W, et al. Effects of chlorhexidine-coated intrauterine device on the bacteriology of the uterine cavity[J]. Advances in Contraception, 1991, 7(1): 55-65.
- [5] Mishell D R, Bell J H, et al. The intrauterine device: A bacteriologic study of the endometrial cavity[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1966, 96(1): 119-126.
- [6] Chicurel M. Bacterial biofilms and infections[J]. Slimebusters Nature, 2000, 408(6810): 284-286.
- [7] Jones H C, Roth I L, Sanders W M, et al. Electron microscopic study of a slime layer[J]. Journal of Bacteriology, 1969, 99(1): 316-325.
- [8] Cryer J, Schipor I, Perloff J R, et al. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis[J]. Journal for Oto-rhino-laryngology and Its Related Specialties, 2004, 66(3): 155-158.
- [9] Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media[J]. Laryngoscope, 2001, 111(12): 2083-2094.
- [10] Vessey M P, Yeates D, Flavel R, et al. Pelvic inflammatory disease and the intrauterine device: Findings in a large cohort study [J]. British Medical Journal, 1981, 282(6267): 855-857.

- [11] Yassien M. Biofilms in device-related infections[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15(3):141-147.
[12] Sparks R A, Purrier B G, Watt P J, et al. Bacteriological coloni-

sation of uterine cavity: Role of tailed intrauterine contraceptive device[J]. British Medical Journal Clinical Research, 1981, 282(6271):1189-1191.

Research about bacteriology on intrauterine device

Zhang Xianghui, Qu Wenwen, Huang Wei, Fang Jie,
Wu Fanzi, Zhou Xinxuan

(West China Second University Hospital, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Background: Intrauterine device (IUD) is one of the most popular method of long-acting contraception, while concerns still exist as to whether the use of IUD increases the risk of pelvic inflammatory disease (PID). In recent years many issues have been extensively researched about the relationship between bacterial biofilm (BF) and infectious diseases. We designed this study to investigate whether BF exists on IUD of non PID women ; and whether IUD increases the susceptibility to PID. Methods: For the study, we recruited 85 participants without PID and a PID patient who choosed IUD as a means of contraception. According to the cleanliness of IUD surface. IUD was removed and sent for scanning electron microscopy (SEM) or/and biological and fungal examination respectively to detect BF. Results: A total of 86 IUDs were recruited , which include stainless steel ring, TCuIUD, Mirena, Multiload, McuIUD and γ Cu380 IUD. Among 25 IUDs which were observed with SEM alone, BF was discovered on a TCuIUD used for one month-a large number of bacilli /cocci and extracellular matrix coverd on the surface of copper. Other specimens had no significant discoveries. The result of 47 microbial culture alone was negative except for one suspected contaminated IUD. 14 IUDS were investigated via both microbial culture and SEM. A 33 year old stainless steel ring which removed because of the symptoms of pelvic pain, aerobic cultivation was positive. But there was no BF detected by SEM. The remaining 13 IUD had no positive result. Conclusions: There was no BF on surface of IUD removed from non- PID women regardless of IUD type; unlike other medical device, the formation of bacterial biofilm should not become a stumbling.

[Key words] intrauterine device; pelvic inflammatory disease; bacterial biofilm; scanning electron microscopy