

人工关节假体感染细菌生物膜诊断的研究进展

孙永,周新社

(蚌埠医学院第一附属医院骨科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:随着行人工关节置换术患者人数的增多,人工关节的感染率也随之增高。由致病细菌形成的细菌生物膜是人工关节感染的重要原因。人工关节表面形成细菌生物膜后,其对相应抗生素的耐药性会提高 10~1 000 倍。针对生物膜的研究越来越多,但对其所致感染的诊断至今仍然很棘手。传统常规的诊断方法敏感性及特异性相对较低,不仅延误时机影响治疗,还会带来灾难性后果。该文主要对人工关节置换术后关节假体感染细菌生物膜的诊断技术及方法进行综述。

关键词:细菌生物膜;人工关节置换;感染;诊断

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.09.004

The research progress for diagnosing bacterial biofilm of prosthetic joint infection

SUN Yong, ZHOU Xinshe

(Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China)

Abstract: Prosthetic joint infection is still a very serious problem. The prosthetic joint infection rate is expected to increase with the increasing number of artificial joint replacement. The bacterial biofilm formation of pathogens is an important cause of the artificial joint infection. The antibiotic resistance of bacterial biofilm will be increased by 10-1 000 times. The studies of the bacterial biofilm are becoming more and more, but the diagnosis of infection is still very difficult. The sensitivity and specificity of traditional diagnostic method are comparatively low, which will not only delay the timing of treatment, but also bring about disastrous consequences. In this paper, a review is made on the diagnostic method of bacterial biofilm of prosthetic joint infection after arthroplasty.

Key words: Bacterial biofilm; Artificial joint replacement; Infection; Diagnosis

目前人工关节置换术已经成为很常见且比较成熟的手术,随着人们对生活质量要求的提高以及人口老龄化的出现,未来人们对该手术的需求将会大幅度增加^[1]。人工关节置换术假体的感染是术后最严重的并发症之一,虽然它的感染率较低,仅为 1%~3%,但它的破坏性很强^[2]。人工关节置换术的假体一旦感染,不仅会给患者本身造成生理、心理的伤害,还会加重经济负担,并浪费大量的社会医疗资源,因此,只有对人工关节置换术后感染行早期、及时和准确诊断,才能尽量减少损失,但是,由于细菌生物膜的形成,一些常规检测方法都有其局限性。目前,诊断感染的金标准仍为穿刺液细菌培养,由于细菌形成的细菌生物膜与假体黏附牢固,且有独特的代谢方式,传统细菌培养检测方法往往很难得到足够样本,会出现假阴性。因此,我们要探索新的、有效的诊断方法,从而明确感

染,及时干预。

1 细菌生物膜与人工关节置换术后感染的关系

细菌生物膜是指细菌为了适应变化的环境,黏附于有活体或无生命物体,如人工关节假体表面、细菌自身产生的胞外多聚物、吸附在表面的营养物质和其代谢产物、细菌裂解后的产物及环境中的某些物质等包裹的细菌群体^[3]。细菌生物膜含有多种复杂成分,其中含水量高达 98%,除水分外大部分成分是蛋白质、核酸、多糖、肽聚糖、脂类等,约占细菌生物膜的 2%~15%^[4]。由于细菌生物膜的上述结构特点,其对环境的适应能力非常强,能够抵抗外界恶劣环境。此外,细菌生物膜的耐药性也非常强,因其可通过多种机制参与对抗生素的耐药,这些机制间还互相促进,进一步使其耐药性增加,这些机制主要有^[5]:(1)渗透限制:此学说认为细菌生物膜可形成限制分子量及电荷排斥的屏障,从而可限制或减慢抗生素渗入生物膜内部,降低有效的杀菌浓度;(2)营养限制:大多数抗生素是杀灭复制繁殖期的细菌,由于细菌生物膜内部营养物质相对

较少,细菌的繁殖速度也相应减慢,进而耐药性就会提高;(3)表达耐药表型:细菌生物膜中的细菌在繁殖过程中会产生有特殊保护作用的细菌生物膜表型,具有抗生素抗性;(4)细菌密度感应系统(QS):细菌生物膜可通过分泌能水解抗生素的酶,产生QS信号,可诱发一系列应激反应,产生特异外排抗生素的效应。细菌生物膜的形成主要经历细菌黏附、细菌生物膜发展、生物膜成熟和细菌播散等过程^[6]。人工假体植入后早期就有宿主大分子或细胞覆盖其上形成条件膜,条件膜或干净的假体表面落上由手术室空气、手术操作时飞屑以及来自皮肤或血源性细菌,关节液中的pH值、表面张力、静电作用等非特异性因素和某些特异性黏附分子的作用可促进细菌与关节假体黏附。细菌生物膜在假体表面不断成熟,最终患者的纤维组织将其包裹。当细菌生物膜内的环境变化,如关节腔内游离病原细菌被敏感抗生素杀死后,细菌生物膜可产生水解酶将细胞外多糖水解或经关节运动作用释放细菌成为游离病原菌,生物膜内细菌游离出来,再次形成游离细菌^[7],游离细菌可再次形成新的生物膜,引起新的感染,进而会形成细菌生物膜的循环。目前临床上应用的抗生素通常只能对细菌生物膜中释放的游离细菌起作用,但不能彻底杀灭、消除细菌生物膜。因此,人工关节细菌生物膜感染通常表现出迁延不愈,直至假体被取出^[8]。

2 诊断技术

目前对生物膜的诊断尚没有一种特别有效的诊断方法,每种方法都存在一定的不足,对诊断人工关节假体生物膜的相关感染,只有将多种诊断技术联合应用,才能比较准确地诊断,例如分子生物学技术、显微镜观测技术、超声技术及其他非特异性检测技术等。其中分子生物学技术检测细菌生物膜不受患者是否有抗生素应用史的影响,可以准确地检测出病原菌,敏感度及特异性高。

2.1 分子生物学技术 聚合酶链反应(PCR)和荧光原位杂交是两种常用的分子生物学方法,在慢性持续性感染中,能够识别80%~100%的病原体^[9]。随着科学技术的发展和医疗检测水平的提高,近年来PCR技术已成为假体周围感染新的诊断方法,并逐渐应用于临床。PCR技术相对于常规诊断方法有很明显的优点:相对于普通细菌培养,首先它对于某些不明确的微生物能明确诊断,不需依靠特殊培养基进行体外培养;并且其所用的时间相对常规普通细菌培养也较短,一般在48h以内,可用于对疑似感染病例的快速诊断,无需依据培养结果;同

时,其敏感性较高,对于有抗生素应用史的患者,能够不受抗生素使用的影响,提高样本中检出致病细菌的概率。但它的缺陷也很明显,除成本较高外,在操作过程中样本易受到污染,导致诊断的假阳性率较高^[10]。有研究^[11]采用细菌16s rRNA基因片段扩增,分析了循环水养殖系统中填料上生物膜和对应生物滤池水体中的细菌群落种类组成。16s rRNA基因位于所有细菌染色体基因上,其相对应的DNA序列可以编码细菌rRNA,但它并不存在于病毒、真菌等非原核生物体内,其内部结构由恒定区及编码区两部分组成,恒定区为所有细菌共有,不同的细菌编码区是不尽相同的。因此,可设计细菌特有的引物对其检测,能在混合感染中鉴别出真正的致病细菌,为抗生素的使用提供依据。研究表明^[12]:应用该方法检测全膝关节置换术术后有疼痛症状的患者可以鉴别单纯疼痛、假体松动及感染,其诊断的敏感性为71%,特异性为100%,总的准确度为94%。Mastronardi等^[13]以*divIVA*和*icaA*作为目标基因,用定量PCR技术可以检测出血小板制剂中致病性表皮葡萄球菌形成的生物膜,从而验证了定量PCR技术对检测生物膜细菌有很高的敏感度。Vandercam等^[14]通过PCR检测细菌核糖体RNA中16s rRNA基因,对41例人工关节感染患者术中行活检、刷取、抽吸所获得的标本,分别进行普通细菌培养和利用细菌16s rRNA基因上特异性的编码区域来制备引物后进行PCR检测,结果发现采用PCR检测16s rRNA基因的检出率高于培养组。荧光染色体原位杂交是通过追踪寡核苷酸探针与细菌特定基因区域进行杂交,利用荧光显微镜或流式细胞技术直观观察结果。通过将不同荧光染料标记于不同荧光探针以实现多种微生物的同步观察,在混合感染时尤为重要。免疫荧光显微镜检查是一种不依赖培养的新技术,主要通过样本与单克隆抗体混合液与细菌细胞壁上特异抗原结合,利用免疫荧光显微镜观察结果,与荧光染色体原位杂交结果相同可直观观察病原体的有机结构^[15]。研究发现^[16],荧光原位杂交技术可以对细菌生物膜的形态学进行更好的观察,应用不同目标探针在同一个样本中测定细菌亚型的技术已应用在牙齿生物膜和菌培阴性生物膜样本中,并且可观测生物膜的空间形态分布。

2.2 显微镜观测技术 激光扫描共聚焦显微镜、扫描电镜及原子力显微镜都是目前比较先进的显微成像技术。常规普通细菌培养时均为阴性的样本,采用免疫荧光显微镜和电子显微镜检测时可以

检出致病菌,有效证明了其检测的敏感性。激光扫描共聚焦显微镜是20世纪80年代发展起来的一项高新技术,因其具有聚焦功能,可以阻挡其他散射光,只对来自焦平面的光成像,从而大大提高了显微镜的分辨能力。它可以对较厚生物膜在不同深度进行无损伤检测及分层扫描,形成断面影像,再通过三维重建得到样本的三维立体结构及三维图像^[17]。使用激光扫描共聚焦显微镜能对关节液、创面及骨水泥表面的细菌生物膜进行观测,更有针对性^[18]。同时其不只是定性观测,还可以对生物膜的厚度、表面积等不同参数进行量化处理,可以对细菌在形成生物膜的动态循环过程中的参数进行量化^[19]。有学者^[20]对细菌生物膜的菌体及内部成分进行免疫荧光标记,进而对细菌及其生物膜形成过程中的多糖形成及细菌分布情况进行动态观察。扫描电子显微镜与光学显微镜原理相近,其电子束和电子透镜相当于光学显微镜的光束和光学透镜,可以提高对被观测样本的放大倍数,其可达纳米级甚至更小的分辨率。但是,由于其电子束不像激光束那样穿过样品,而仅在样品表面扫描而成像,故扫描电镜是不能产生三维图像的,显然也不能显示细菌生物膜基质的内部结构,同时电镜观察需要对被观测样本进行脱水、染色等前期处理,难免会对生物膜结构和其成分性质产生影响,观测到的结果会失真,但其优点就是更易分辨细菌生物膜的细菌细胞聚集。原子力显微镜是通过检测样本表面和微型力敏感元件之间的极微弱的原子间相互作用力来实现对物质的表面结构及性质的观测。将一对微弱力极端敏感的微悬臂一端固定,另一端的微小针尖接近样本,它们之间的相互作用作用力将使微悬臂发生形变位移。Ansari等^[21]利用原子力显微镜观察白色念珠菌的细胞膜形成过程以及枣蜜对整个过程的作用,结果表明枣蜜对白色念珠菌的细胞形态以及其形成生物膜的厚度都有影响。

2.3 超声技术 人工关节细菌感染后,细菌以细菌生物膜的方式存在,假体周围软组织中或关节液中游离方式存在的细菌很少^[22]。另外由于细菌生物膜被细胞外基质包裹,游离出的细菌少,进而引起的感染较为局限,患者全身症状也不明显,往往普通细菌培养为假阴性结果,使其无法准确诊断或被误诊。为提高细菌培养的敏感性,目前经超声降解人工假体表面的生物膜后再进行取样行细菌培养的技术已得到了广泛临床证实。超声波产生数以百万的微观气泡,通过关节液传播到关节假体,这些气泡破裂后,有足够的力量破坏假体上的细菌

生物膜,使细菌进入关节液,进而可以被取样培养^[23]。因此其相对于普通细菌培养具有更高的培养敏感性,且对于已应用抗生素的患者,超声裂解液培养可提高人工关节感染诊断阳性率,同时还能检测出包括难以培养的厌氧菌、胶状质溶杆菌和一些目前无法培养的菌种在内的更多的致病菌,得到更广的细菌谱,具有更短的培养周期,能更及时的指导临床用药^[24]。Trampuz等^[25]做过一项前瞻性研究,利用超声裂解黏附于331例人工关节置换假体上的细菌生物膜,样本经沉淀后培养,其敏感性为79%,而普通细菌培养敏感性为61%,差异有统计学意义;对使用抗生素的患者采用同样方法检测,其超声处理和普通细菌培养敏感性分别为75%和45%,差异有统计学意义,超声裂解培养液细菌培养被很多学者接受^[26]。目前有出现将超声波降解技术与PCR检测技术相结的检测技术,这样能综合两者的优势^[27]。Gomez等^[28]将超声波降解技术与PCR检测技术相结合大大提高了敏感性,并有很高的特异性。Achermann等^[29]使用类似的超声联合PCR方法,将处理液使用多重PCR方法对细菌DNA进行检测,结果提示对于使用了抗生素的患者,使用多重PCR检测出细菌的阳性率高达100%,远高于传统培养的59%,提示该方法能用来明确手术期间使用过抗生素患者的病原菌。

2.4 其他非特异性检测技术

2.4.1 核医学技术 近年来随着核医学科的发展,核医学成像技术也逐渐完善,对诊断人工关节置换后感染有一定的敏感性,但其特异性还不被大多数学者接受。核医学成像技术可用来检测关节假体周围组织的炎症反应。对关节置换术后疼痛的患者进行检查时,放射性同位素扫描可以鉴别关节感染和假体无菌性松动。有文献报道^[30],用高锝(^{99m}Tc)标记单克隆抗体骨扫描对人工关节假体感染检测有很高的敏感性,其敏感性可达81%,但其特异性较低。因为以^{99m}Tc标记的单克隆抗体Tab片断的特异性、准确性较^{99m}Tc-MDP高,镓-67则正好敏感性低而特异性高。有研究表明^[31],将^{99m}Tc与镓-67的结合使用会提高对假体感染诊断的准确度,并且可同时提高诊断的敏感性和特异性,可高达90%以上,也有研究表明,将铟-111(¹¹¹In)标记的自体白细胞和^{99m}Tc标记的硫胶体骨髓联合进行骨扫描成像,两者的敏感度和特异度也都有提高,且准确度也高达95%,由于其尚不完善,目前仍处于研究中^[32]。

2.4.2 氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层扫描(FDG-

PET) FDG-PET 的原理是将人体内代谢必须的物质(如脱氧葡萄糖)用氟-18 等半衰期较短的放射性核素进行标记,制成显像剂 FDG,再将显像剂注入人体进行扫描成像。由于炎性组织中 FDG 较正常组织的蓄积速度快,示踪剂注射 2 h 之内即可完成整个扫描过程。将其与 CT 扫描联合运用可提供更好的空间分辨率^[33]。有研究表明^[34],FDG-PET 扫描诊断髋关节置换术后假体感染的敏感度为 82.8%,特异度为 87.3%,但由于部分金属假体影响,使得计算机断层扫描作用受到限制,易产生伪影像,故其临床运用价值仍有争议。

3 结语

人工关节置换术后假体周围细菌生物膜感染是公认的重大难题,对其诊断一直没有相对统一的方法。由于细菌生物膜与假体黏附牢固,并且采取相对缓慢的代谢方式,传统细菌培养检测方法往往无法获取满意的样本,往往得到假阴性的结构。分子生物学技术、超声技术以及现代核医学技术都有其自身的局限性,这也是现在没有统一标准的原因。随着科学技术的发展,每项诊断技术都将更新,我们需要取长补短,联合多种诊断手段,尽可能做到微创、及时、准确诊断人工关节细菌生物膜感染。

参考文献

- [1] GBEJUADE HO, LOVERING AM, WEBB JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections[J]. *Acta Orthop*, 2015, 86(2):147-158.
- [2] PARVIZI J, ERKOCAK OF, DELLA VALLE CJ. Culture-negative periprosthetic joint infection[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2014, 96(5):430-436.
- [3] HØIBY N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections[J]. *Pathog Dis*, 2014, 70(3):205-211.
- [4] 戚韩英,汪文斌,郑昱,等. 生物膜形成机理及影响因素探究[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(4):677-685.
- [5] 李建华,宋丰贵. 细菌生物膜形成与细菌耐药机制研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27(1):70-74.
- [6] 祝司霞. 细菌生物膜的结构及形成机制的研究进展[J]. *沈阳医学院学报*, 2015, 17(2):115-117.
- [7] 崔海英,张雪婧,赵呈婷,等. 细菌生物膜的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(8):11-14.
- [8] 吴岳嵩,王志伟,徐卫东. 细菌生物膜与人工关节感染[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2012, 6(6):952-961.
- [9] ESTEBAN J, ALONSO-RODRIGUEZ N, DEL-PRADO G, et al. PCR-hybridization after sonication improves diagnosis of implant-related infection[J]. *Acta Orthop*, 2012, 83(3):299-304.
- [10] LÉVY PY, FENOLLAR F. The role of molecular diagnostics in implant-associated bone and joint infection[J]. *Clin Microbiol In-*

- fect, 2012, 18(12):1168-1175.
- [11] 李倩,胡廷尖,辛建美,等. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析 3 种生物填料上生物膜的细菌群落组成[J]. *大连海洋大学学报*, 2016, 31(4):384-389.
- [12] CHOI HR, VON KNOCH F, ZURAKOWSKI D, et al. Can implant retention be recommended for treatment of infected TKA[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469(4):961-969.
- [13] MASTRONARDI CC, RAMÍREZ-ARCOS S. Quantitative PCR for detection and discrimination of the bloodborne pathogen *Staphylococcus epidermidis* in platelet preparations using *divIVA* and *icaA* as target genes[J]. *Can J Microbiol*, 2007, 53(11):1222-1231.
- [14] VANDERCAM B, JEUMONT S, CORNU O, et al. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection[J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(6):537-543.
- [15] AMANN R, FUCHS BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(5):339-348.
- [16] AL-AHMAD A, WUNDER A, AUSCHILL TM, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56(5):681-687.
- [17] PSALTIS AJ, HA KR, BEULE AG, et al. Confocal scanning laser microscopy evidence of biofilms in patients with chronic rhinosinusitis[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(7):1302-1306.
- [18] STOODLEY P, NISTICO L, JOHNSON S, et al. Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty. A case report[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(8):1751-1758.
- [19] SHUKLA SK, RAO TS. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: a confocal laser scanning microscopic study[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 103:448-454.
- [20] 宋菲,向军,陆树良. 激光共聚焦显微镜和改良微孔板法观察细菌生物膜形成[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(5):368-372.
- [21] ANSARI MJ, AL-GHAMDI A, USMANI S, et al. Effect of jujube honey on *Candida albicans* growth and biofilm formation[J]. *Arch Med Res*, 2013, 44(5):352-360.
- [22] CHEN-CHARPENTIER BM, STANESCU D. Biofilm growth on medical implants with randomness[J]. *Mathematical and Computer Modelling*, 2011, 54(7):1682-1686.
- [23] 郭国栋,褚立涛,郭亭,等. 超声裂解法处理人工关节感染假体细菌培养敏感性与特异性的 Meta 分析[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(11):1168-1172.
- [24] PORTILLO ME, SALVADÓ M, ALIER A, et al. Advantages of sonication fluid culture for the diagnosis of prosthetic joint infection[J]. *J Infect*, 2014, 69(1):35-41.
- [25] TRAMPUZ A, OSMON DR, HANSEN AD, et al. Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003(414):69-88.
- [26] EVANGELOPOULOS DS, STATHOPOULOS IP, MORASSI GP, et al. Sonication: a valuable technique for diagnosis and treatment of periprosthetic joint infections[J]. *Scientific World Journal*, 2013, 2013:375140.