

· 临床研究 ·

亚甲蓝对关节假体周围感染细菌培养的影响[△]

刘侃^{1,2}, 陈继营^{2*}, 郝立波², 戴倩梅³

(1. 北京中医药大学第三附属医院骨科, 北京 100029; 2. 中国人民解放军总医院骨科, 北京 100853;
3. 解放军 902 医院, 安徽蚌埠 233000)

摘要: [目的] 探讨染色剂亚甲蓝对关节假体周围感染组织样本细菌培养的影响。[方法] 对 2017 年 10 月—2019 年 10 月诊断为关节假体周围感染的患者 116 例, 均行二期髌/膝关节翻修手术。术中取出至少 3 份假体周围组织进行细菌培养, 将每份组织块平均分为两份, 用 0.1% 亚甲蓝注射液将其中一份组织染色, 另一份作为对照组不做染色处理。比较两组最终的培养阳性率及细菌鉴定情况。[结果] 116 例患者中亚甲蓝组的细菌培养阳性率为 81.89%, 而非亚甲蓝组的细菌培养阳性率为 86.21%, 差异无统计学意义 ($P=0.370$)。从两组中相对应的组织块培养结果来看, 亚甲蓝对产酸克雷伯菌和除溶血葡萄球菌之外的凝固酶阴性葡萄球菌有不同程度的抑菌作用, 而对金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、无乳链球菌、革兰阳性杆菌、粪肠球菌和屎肠球菌均无影响。[结论] 亚甲蓝溶液可能会使关节假体周围感染中某种细菌的检出受到影响。

关键词: 关节假体周围感染, 亚甲蓝, 组织细菌培养, 生物膜

中图分类号: R687 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 18-1697-03

Effect of methylene blue on bacterial culture in periprosthetic joint infection // LIU Kan^{1,2}, CHEN Ji-ying², HAO Li-bo², DAI Qian-mei³. 1. Department of Orthopedics, Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Department of Orthopedics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 3. 902 Hospital of PLA, Bengbu 233000, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of methylene blue (MB), a disclosing agent, on bacterial culture in periprosthetic joint infection (PJI). **[Methods]** A total of 116 patients who received two-stage revision surgeries for PJI secondary to hip or knee arthroplasty from October 2017 to October 2019 were included in the study. At least 3 periprosthetic tissues were harvested during surgery for bacterial culture. Each tissue sample was divided into two equal parts, one was stained with 0.1% MB solution, while other one was used as a control group without MB staining. The consequences of bacterial culture and identification were compared between the two groups. **[Results]** The positive rate of bacterial culture was of 81.89% in the MB group, whereas 86.21% in the non-MB group, which proved not statistically significant between them ($P=0.370$). As results of bacterial identification, MB had antimicrobial effects in some extent on *Klebsiella oxytoca* and Coagulase-negative *Staphylococcus* other than *Staphylococcus haemolyticus*. **[Conclusion]** MB solution might impact the detection of certain bacteria in PJI.

Key words: periprosthetic joint infection, methylene blue, tissue sample for bacterial culture, biofilm

关节假体周围感染 (periprosthetic joint infection, PJI) 是关节置换术后严重的并发症^[1], 由于临床症状的不典型和无特异的检测手段导致 PJI 的诊断困难重重。目前病原学检测依然是诊断 PJI 必不可少的手段, 其中假体周围组织中培养出细菌是诊断的“主要标准”之一^[2]。合适的组织取样是保证细菌培养结果可信的重要前提^[3]。近年来, 有学者报道亚甲蓝可以使细菌生物膜着色, 以便术中鉴别感染组织进行培养标本的取样和彻底的清创, 从而提高病原检出率和治

疗有效率^[4, 5]。但亚甲蓝应用于 PJI 诊断方面的研究甚少, 且亚甲蓝有一定的抗菌特性^[6], 所以对于这种方法是否可以提高培养阳性率目前仍无确切的证据。因此, 本研究评估亚甲蓝在识别感染组织的同时是否会对细菌培养的结果产生影响。

1 临床资料

1.1 一般资料

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.18.14

△基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81672192)

作者简介: 刘侃, 主治医师, 医学博士, 研究方向: 关节外科、脊柱外科, (电话) 13146954969, (电子信箱) atmlkmd@126.com

* 通信作者: 陈继营, (电话) 010-66875504, (电子信箱) 165693191@qq.com

2017年10月—2019年10月解放军总医院关节外科收治的确诊为PJI的116例患者,所有患者均符合改良肌肉与骨骼感染协会(Musculoskeletal Infection Society, MSIS)诊断标准^[2],均拟行一期髌/膝关节假体取出+清创+骨水泥占位器置入术;排除不符合改良MSIS诊断标准者及未行翻修手术者。其中男48例,女68例,平均年龄(63.22±9.74)岁,髌关节62例,膝关节54例。依据术前医患沟通结果,所有患者在二期取出假体置入占位器的手术中进行假体周围组织的采样。本研究获医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 样本采集

髌关节翻修采用髌后外侧入路,依次切开皮肤、浅深筋膜层,钝性分离阔筋膜和臀大肌,切开外旋肌群和关节囊,显露出髌关节假体,将术中所见疑似感染的假体周围组织进行取样(至少3份),于髌臼侧、股骨侧及关节囊处至少各取1份组织。膝关节翻修采用膝前正中皮肤切口髌旁内侧入路,依次切开皮肤、浅深筋膜层、关节囊,逐层暴露膝关节假体后于股骨侧、胫骨侧及关节囊处至少各取1份组织。用无菌组织剪将术中3份不同部位的组织平分2份,分别置入准备好的无菌样品杯内并对应标记为亚甲蓝组(3个)和非亚甲蓝组(3个)。将1%MB注射液稀释10倍后分别加入亚甲蓝组的3个样品杯内使组织块均匀染色60s即可^[4]。

1.3 检测方法

关节液检测:术前或术中常规进行关节液的采样,并把所得的标本注入血培养瓶中进行需氧、厌氧和真菌培养及关节液常规计数检查。另取少量关节液(1滴)行白细胞酯酶试纸检测。

假体周围组织检测:所有患者术中均取3份可疑组织进行快速冰冻切片,此部分由病理科协助完成。此外,术中采集的组织标本(亚甲蓝组和非亚甲蓝组)送至微生物科分别进行普通细菌培养和厌氧、真菌培养。

1.4 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验,或校正 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

116例患者中亚甲蓝组细菌培养的阳性率为81.89%(95/116),而非亚甲蓝组细菌培养的阳性率

为86.21%(100/116),两组比较差异无统计学意义($P=0.370$),可以认为亚甲蓝注射液对组织细菌培养的阳性率并无明显影响。两组培养结果均为阴性的患者中,11例可能是由于术前2周内使用过万古霉素而导致所有的培养结果呈阴性,另5例可能是由于术中取材不合适的原因所致。

亚甲蓝组细菌培养结果为阳性的95例患者中,鉴定出金黄色葡萄球菌41例,表皮葡萄球菌26例,人葡萄球菌14例,溶血葡萄球菌6例,化脓链球菌7例,无乳链球菌13例,藤黄微球菌3例,革兰阳性杆菌22例,粪肠球菌9例,屎肠球菌6例,阴沟肠杆菌4例。

非亚甲蓝组细菌培养结果为阳性的100例患者中,鉴定出金黄色葡萄球菌41例,表皮葡萄球菌27例,人葡萄球菌20例,溶血葡萄球菌6例,化脓链球菌7例,无乳链球菌13例,头状葡萄球菌7例,沃氏葡萄球菌6例,革兰阳性杆菌22例,粪肠球菌9例,屎肠球菌6例,产酸克雷伯杆菌14例。

从两组中相对应的组织块培养结果来看,亚甲蓝对产酸克雷伯杆菌有抑制作用,而对金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、无乳链球菌、革兰阳性杆菌、粪肠球菌和屎肠球菌均无影响。除溶血葡萄球菌未受影响之外,其余的凝固酶阴性葡萄球菌均受到了不同程度的影响,提示亚甲蓝可能对该类型的葡萄球菌有抑制作用。此外,亚甲蓝组结果中出现少量的阴沟肠杆菌和藤黄微球菌,考虑可能为标本取材偏差的问题或是标本染色过程中受到污染的可能。

3 讨论

亚甲蓝是一种阳离子染料,已被证实有结合和染色灭活的真核细胞以及细菌生物膜的能力^[7],可以半选择性地染色细菌生物膜和非活性的宿主组织^[8,9]。其作为一种带有生物膜染色能力的吩噻嗪类染料,可通过吸收光线而增强DNA损伤介导的抗菌作用,但对人体没有毒性反应^[6]。因此,十几年来口腔科医生应用亚甲蓝来识别牙菌斑和治疗牙周感染^[10,11]。而在骨科领域,亚甲蓝可通过加入骨水泥中应用于关节置换术,也可在PJI术中标定窦道的界线以及作为评估创伤性关节切开术的辅助手段^[12-14]。所以有学者认为采用这种方法可以成功地清除所有失活的组织^[15],并且通过染色组织的培养可以提高病原检出率^[4]。

Silva等^[16]对比了各种染色剂的可着色性和抗菌性能,包括0.05%亚甲蓝、4%赤藓红和1%中性红,

最后发现 0.05% 的亚甲蓝有最好的染色性能和最小的抑菌效应。另有研究证明 0.1% 亚甲蓝溶液可以染色慢性感染的组织，并且通过定量培养和定量聚合酶链式反应分析发现染色组织中细菌的菌落数量较未染色组织更多^[4]。本研究发现亚甲蓝组未能鉴定出产酸克雷伯菌。由于克雷伯氏菌是重要的条件致病菌，本研究怀疑亚甲蓝对某些 PJI 重要致病菌具有抑菌作用。而对于凝固酶阴性葡萄球菌，本研究结果显示某些染色标本未能识别出头状葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、人葡萄球菌和表皮葡萄球菌的情况。结合其他文献报道的结果及本团队的基础实验结果^[17]，作者认为 0.1% 亚甲蓝溶液对凝固酶阴性葡萄球菌可能具有不同程度的抑制作用，但需要更多的研究证据来证明。

对于结果与其他研究有差异的现象^[4, 5]，作者认为可能原因是临床标本的研究中，作者并没有进行细菌的定量培养，只是鉴定出了细菌的种类。而其他研究中虽然进行了定量培养却没有具体说明细菌的种属情况，因此对于亚甲蓝抑制何种细菌也不得而知。虽然本研究中发现亚甲蓝对某些细菌有一定的抑菌作用，但培养的阳性率并没有受到显著影响。因此，亚甲蓝是否会在组织培养标本的采样过程中发挥积极作用仍需要今后的进一步验证和研究。

参考文献

- [1] Liu K, Ye L, Sun W, et al. Does use of lidocaine affect culture of synovial fluid obtained to diagnose periprosthetic joint infection (PJI)? An in vitro study [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24 : 448-452.
- [2] Parvizi J, Fassihi SC, Enayatollahi MA. Diagnosis of periprosthetic joint infection following hip and knee arthroplasty [J]. *Orthop Clin North Am*, 2016, 47 (3) : 505-515.
- [3] 谭冠中, 刘侃, 陈继营, 等. 利多卡因对细菌培养影响的实验研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27 (14) : 1302-1305.
- [4] Shaw JD, Miller S, Plourde A, et al. Methylene blue guided debridement as an intraoperative adjunct for the surgical treatment of periprosthetic joint infection [J]. *J Arthroplasty*, 2017, 32 (12) : 3718-3723.
- [5] Parry JA, Karau MJ, Kakar S, et al. Disclosing agents for the intraoperative identification of biofilms on orthopedic implants [J]. *J Arthroplasty*, 2017, 32 (8) : 2501-2504.
- [6] Schneider JE, Price S, Maitt L, et al. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18 (3) : 631-635.
- [7] Coulthwaite L, Verran J. Evaluation of in vivo denture plaque assessment methods [J]. *Br Dent J*, 2009, 207 (6) : E12.
- [8] Dorafshar AH, Gitman M, Henry G, et al. Guided surgical debridement: staining tissues with methylene blue [J]. *J Burn Care Res*, 2010, 31 (5) : 791-794.
- [9] Endara M, Attinger C. Using color to guide debridement [J]. *Adv Skin Wound Care*, 2012, 25 (12) : 549-555.
- [10] Briggs T, Blunn G, Hislop S, et al. Antimicrobial photodynamic therapy—a promising treatment for prosthetic joint infections [J]. *Lasers Med Sci*, 2018, 33 (3) : 523-532.
- [11] Paranhos H de F, da Silva CH, Venezian GC, et al. Distribution of biofilm on internal and external surfaces of upper complete dentures: the effect of hygiene instruction [J]. *Gerodontology*, 2007, 24 (3) : 162-168.
- [12] Metzger P, Carney J, Kuhn K, et al. Sensitivity of the saline load test with and without methylene blue dye in the diagnosis of artificial traumatic knee arthroplasties [J]. *J Orthop Trauma*, 2012, 26 (6) : 347-349.
- [13] Galasso O, Mariconda M, Calonego G, et al. Physical, mechanical and pharmacological properties of coloured bone cement with and without antibiotics [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2011, 93 (11) : 1529-1536.
- [14] Kelm J, Schmitt E, Konstantinos A. Vacuum-assisted closure in the treatment of early hip joint infections [J]. *Int J Med Sci*, 2009, 6 (5) : 241-246.
- [15] Calanna F, Chen F, Risitano S, et al. Debridement antibiotic pearls and retention of the implant (DAPRI): a modified technique for implant retention in total knee arthroplasty PJI treatment [J]. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 2019, 27 (3) : 2309499019874413.
- [16] Silva CH, Paranhos HF, Ito IY. Biofilm disclosing agents in complete denture: clinical and antimicrobial evaluation [J]. *Pesqui Odontol Bras*, 2002, 16 (3) : 270-275.
- [17] 刘侃, 陈继营, 郝立波. 亚甲蓝对体外不同细菌培养结果的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30 (6) : 481-484.

(收稿:2021-08-01 修回:2022-06-23)

(同行评议专家: 贾庆卫)

(本文编辑: 闫承杰)