技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)06-0900-03

兔人工膝关节感染模型的构建

翁 玄,张 健,朱勇军
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立兔的人工膝关节感染模型。方法:以长 15 mm 的 3 mm 克氏针作为膝关节内置物,通过兔的股骨髁间窝植入股骨远端。对 48 只成年新西兰大白兔行上述手术,并随机分为 A、B、C、D 4 组:A 组在切口缝合后即刻向关节腔内接种 0.5 ml 1×10^7 集落形成单位(Colony forming unit,CFU)的金黄色葡萄球菌 ATCC25923,B 组接种 0.5 ml 1×10^6 CFU 的细菌,C 组接种 0.5 ml 1×10^5 CFU 的细菌,D 组不接种细菌。于术后分别观察伤口情况,拍摄 X 线片,细菌培养、组织学变化及 C- 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)和红细胞沉降率(Erythrocyte sedimentation rate,ESR)的变化。结果:术后 14 d,A 组 100%(11/11)感染,B 组 100%(12/12)感染,C 组 83.3%(10/12)感染,D 组无感染;光镜下可见感染内置的克氏针周围炎性细胞较未感染者多;血清 CRP 和 ESR 在术后持续保持较高水平。结论:应用该方法术后接种 0.5ml 1×10^6 CFU 金黄色葡萄球菌到膝关节,14 d 后可以成功建立膝关节置换术(Total knee arthroplasty,TKA)后感染模型。

【关键词】关节置换;人工关节感染;动物模型
【中国图书分类法分类号】R687.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-16

Establishment of knee arthroplasty infection model in rabbits

WENG Xuan, et al
(*Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To design knee prostheses infection modal for rabbits. *Methods*: The knee implants were designed with 3mm Kirschner wire for the length of 15mm. Implanted the stem to the distal femoral through intercondylar fossa. forty eight rabbits were divided into 4 groups randomly, 12 in each group and finished above-mentioned surgery. Immediately after the surgery, 0.5 ml 1×10^7 CFU of Staphylococcus aureus ATCC 25923 was injected into the joints of group A, 0.5 ml 1×10^6 CFU in group B and 0.5 ml 1×10^5 CFU in group C, group D were not injected. the animals were sacrificed 2 weeks after injections, and wounds were observed and X-ray films were taken. levels of serum CRP and ESR determined, pathological changes were observed and bacteria cultures were performed. *Results*: After staphylococcus aureus was injected into the joints right after the surgery. 100% knee joint infection in group A and 100% in group B, 83.3% in group C, none knee joint infection in group D. A large amount of inflammatory cells were found in the infected samples, and the levels of serum CRP and ESR were elevated in the infected samples. *Conclusion*: An animal model of TKA infection can be established successfully at 2 weeks by 0.5 ml 1×10^6 CFU staphylococcus aureus ATCC25923 injecting into the joints immediately after the surgery.

【Key words】Arthroplasty; Prosthetic-joint infections; Animal modal

随着骨科技术的发展膝关节置换已经成为了关节外科常见的手术,同时关节置换术后的并发症也在增多,如松动、感染等。而感染则是导致关节置换手术失败的主要原因,有报道指出有 64%的翻修术是由于感染所引起的[1]。感染一旦发生,对临床治疗是一个严峻的挑战,所以模拟人工关节感染,并对其行针对性治疗措施是大有裨益的。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为 48 只平均体重 2.5 kg 的新西兰大白兔(购于重庆医科大学动物中心),在手术前观察 6 d;金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923 由重庆医科大学检验科细菌培养室提供。

1.2 膝关节内置物的植入

戊巴比妥钠(30 g/L)1 ml/kg 耳缘静脉麻醉,在右侧髌骨外侧 0.5 cm 处作一 2 cm 的纵行切口,切开膝关节,暴露股骨髁间窝;在髁间窝中点用 3.0 mm 的钻头延股骨长轴方向钻通髓腔,植入克氏针,逐层缝合关闭关节囊。

1.3 细菌的接种

将金黄色葡萄球菌菌种置于保存培养基中,在 4℃的冰箱中保存,与使用前 1 d 复温,于 M-H 肉汤琼脂培养基中培养 18~24 h,取菌落用生理盐水配成菌液,以 VITEK 比浊仪粗侧细菌浓度,血细胞计数板精确计数,2 h 内使用。实验动物做完上述手术,缝合切口后,将配好的菌液注射入右膝关节腔。

作者介绍:翁 玄(1983-),男,硕士,
研究方向:人工关节与肿瘤。
通讯作者:张 健,男,教授,E-mail:68733235@sohoo.com。
基金项目:重庆市科委自然科学基金(编号:CSTC,2008BB5213)。

1.4 实验分组

大于 5 月龄的新西兰大白兔 48 只,体重 2~2.5 kg,平均 2.314 kg,雌雄不拘,按上述的方法向兔的股骨髁间窝植入内置物,接种细菌。根据接种细菌的浓度随机分为 4 组,每组 12 只:A 组将 0.5 ml,1×10^7 集落形成单位 (Colony forming unit,CFU) 在切口缝合后立即注入右膝关节腔;B 组接种 0.5 ml,1×10^6 CFU 的细菌;C 组接种 0.5 ml,1×10^5 CFU 的细菌,D 组不接种细菌。围手术期不用抗生素,术后动物分笼喂养,肢体不制动,随意活动。

1.5 检测指标

1.5.1 大体观察 手术后喂养 14 d,观察右侧膝关节活动度,伤口愈合情况,有无红肿、窦道形成,局部皮温等一般情况。

1.5.2 影像学观察 术后将动物固定于硬纸板上右膝伸直位摄右膝关节正位 X 片。

1.5.3 血清 C- 反应蛋白 (C-reactive protein,CRP) 和血沉 (Erythrocyte sedimentation rate,ESR) 的测定 分别于兔在植入克氏针术前及术后第 1、3、7、14 d,共 5 个时相点每组随机选择 8 只动物,耳缘静脉各抽取静脉血 5 ml。其中 2 ml 用以测定血清 CRP,另外 3 ml 用以测量 ESR(由重庆医科大学附属第一医院检验科完成)。

1.5.4 组织观察 术后 14 d 处死动物,每组随机选择 6 只动物,取右侧股骨下端 1.5 cm,取出内置物,用 10%的多基甲醛固定 7 d;再用 EDTA 脱钙,常规石蜡包埋切片,厚 5 μm,HE 染色,光镜下观察内置克氏针周围组织形态。

1.5.5 细菌学检测 术后 14 d 处死动物,分别取关节腔内肉芽组织和内置克氏针周围组织各 1 g,均浆后做细菌培养,两者之一若组织出现金葡菌培养阳性,测可判定为感染。

1.6 统计处理

计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示采用 SPSS13.0 统计软件来进行统计分析计量资料数资用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况

手术 14 d 后,A 组由于感染症状过重死亡 1 只,剩余 11 只,B、C、D 3 组 12 只均存活;A 组 11 只,B 组 9 只,C 组 6 只在膝关节周围软组织内形成脓肿,局部皮温明显升高。C 组切口愈合情况要明显好于 A、B 2 组,而 D 组膝关节切口都完全愈合,无感染迹象。

2.2 影像学结果

术后摄 X 线片显示所有内置的克氏针位置均良好,其边界模糊,周围出现 X 线透亮带,股骨下端骨质密度增高,部分囊性变(图 1)。未感染的边界清晰(图 2)。

2.3 ESR、CRP 检测

CRP、ESR 结果表明(表 1,2),术后从第 1~14 d 一直持续较高水平,和术前相比均有明显升高($P<0.05$)。

2.4 组织学观察

光镜下可见感染的内植物周围有大量炎性细胞浸润(图 3),未感染者则炎性细胞和红细胞较少(图 4)。

2.5 细菌培养

以细菌培养阳性作为感染与否的指标,阳性者可明显看到典型的淡黄色金黄色葡萄球菌的菌落单位。结果 A 组 100%(11/11)感染,B 组 100%(12/12)感染,C 组 83.3%(10/12)感染,D 组无感染。



图 1 感染的内置物周围密度增高,边界模糊



图 2 未感染的内置物边界清晰

表 1 兔术后各时相点[ESR(mm/h),$\bar{x}\pm s$]

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	P 值
A	1.50 ± 0.76	2.38 ± 0.92	8.00 ± 1.14	15.90 ± 2.03	11.75 ± 1.75	<0.05
B	1.75 ± 0.71	2.88 ± 0.99	6.50 ± 1.07	14.88 ± 2.23	9.63 ± 1.92	<0.05
C	1.63 ± 0.74	3.13 ± 1.13	5.75 ± 1.28	11.75 ± 2.12	8.50 ± 1.42	<0.05
D	1.70 ± 0.71	2.13 ± 1.13	2.38 ± 1.30	2.00 ± 076	2.13 ± 0.99	>0.05

表 2 兔术后各时相点[CRP(mg/L),$\bar{x}\pm s$]

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	P 值
A	0.52 ± 0.14	5.45 ± 1.13	10.01 ± 1.20	8.37 ± 1.01	7.46 ± 0.85	<0.05
B	0.53 ± 0.16	5.07 ± 1.06	9.30 ± 1.15	8.08 ± 1.07	7.29 ± 0.78	<0.05
C	0.51 ± 0.12	4.96 ± 1.15	8.24 ± 1.14	7.11 ± 0.87	6.72 ± 0.68	<0.05
D	0.55 ± 0.17	0.41 ± 0.10	0.48 ± 0.14	0.39 ± 0.09	0.56 ± 0.14	>0.05

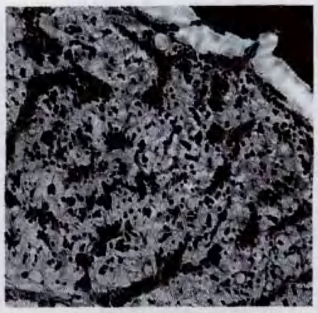


图 3　感染的内置物周围有大量炎性细胞浸润（HE×200）

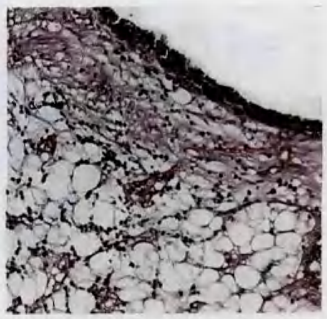


图 4　未感染的内置物周围炎性细胞较少（HE×100）

3　讨　论

膝关节置换术后感染是一个灾难性的并发症，其治疗方法很多包括抗生素冲洗、清创、翻修甚至截肢等。然而无论采取哪种方案都会对患者后期康复及功能恢复有严重的影响。因此，建立一个较合理的人工关节感人模型以便更好的探讨人工关节感染的病因以及治疗策略是很必要的。

要建立人工关节感染模型，首先需要定制一个合适的假体。目前有人用 PMMA 或者不锈钢制作与股骨形状密切匹配的假体[2,4]。前者可塑性强易于与骨髓腔匹配，但是不是金属质地，不能形成金属内置物表面特有的生物膜，后者虽然更接近于临床所使用的假体，但是加工过程复杂成本高昂。本实验选择克氏针作为膝关节内植物相对而言更易获得且制作成本更为低廉，同时能够较好的模仿金属内置物的植入。

人工关节感染可以由多种细菌引起，根据一些多中心随机对照实验的临床分析显示，金黄色葡萄球菌菌、凝固酶阴性表皮葡萄球菌、革兰阴性杆菌等均可导致人工关节的感染，但是以革兰阳性葡萄球菌最为常见。本实验采用革兰阳性金葡菌标准株 ATCC25923 更具有代表性。就接种方式和接种量而言，早在 1981 年 Blomgren 等[2]就通过静脉方式接种 1×10^7 CFU 金葡菌导致 1/3 骨水泥髋关节假体感。后来吴宇黎[3]等在大鼠膝关节假体置换术后即刻接种表皮葡萄球菌 10^7 CFU，造成大鼠全部感染。王子明[4]在兔的髋关节置换术后立刻注射 10^6 CFU 的表皮葡萄球菌，也可造成 75%的假体感染。E. Sheehan[5]则将假体于菌液中浸泡 1 h 后在注射 10^8 CFU 的金黄色葡萄球菌造成 100%假体感染，然而 Matthew R[6]等，在对比了在不同浓度下金黄色葡萄球菌引起兔 UHMWPE 膝关节置换感染的情况，认为只需细菌浓度在 10^3 CFU 就可以引起假体感染，增高细菌的量可以加重感染症状而对假体感染并无益处。然而究竟其感染剂量（Infective dose，ID）是多少呢？由于所选细菌毒力的不同和接种方法的差异，目前尚无定论。本实验选用 0.5 ml 1×10^7 CFU、0.5 ml 1×10^6 CFU、0.5 ml 1×10^5 CFU 三种剂量的金黄色葡萄球菌为研究对象，结果表明 0.5 ml 1×10^7 CFU 和 0.5 ml 1×10^6 CFU 都可造成模型的 100%感染，其中由于感染症状过重 0.5 ml 1×10^7 CFU 组死亡 1 只，0.5 ml 1×10^6 CFU 组无一例死亡，而 0.5 1×10^5 CFU 则可以造成 83.3%的模型感染。证明 0.5 ml $\times10^6$ CFU 在建立兔人工膝关节关节感染模型上是安全有效的，且有较好的可重复性。

本实验选择在股骨下端髁间窝植入克氏针，是为了模仿人工膝关节置换中股骨端假体的植入，同时相对于胫骨平台的操作更为方便、更有利细菌的注射，并且对兔的膝关节的干扰更少，而且我们选择的髌骨外侧切口可以避开对兔股骨下端内侧的大血管的损伤，以减少术中出血，提高动物的术后生存率。

ESR 是红细胞的沉降速度，红细胞的沉降速度与血浆中免疫球蛋白和纤维蛋白原的水平呈正相关，其含量越高 ESR 也就越快，故感染时 ESR 会明显增加。CRP 是在 1930 年发现，由肝脏合成，是 5 个相同的球体形单体以非共价键结合而成的环形五聚体[7]。它能够结合并识别细菌的细胞膜，增强炎性细胞的活性，促进其对细菌的反应。其半衰期为 15 h，因其半衰期短，在急性感染发生后很短时间内会很快升高，且持续时间与病程相关，然而感染一旦得到控制其含量就会迅速下降。临床应用 CRP 和 ESR 与感染呈正相关，变化也基本一致。ESR 和 CRP 在临床多应用于关节置换感染的监控，若一直维持高水平，则可以提示感染模型建立成功。

综上所述，应用 15 mm 长的 3 mm 克氏针作为膝关节内置物经股骨髁间窝植入股骨远端，术后膝关节腔内即刻接种 0.5×10^6 CFU 的金黄色葡萄球菌，14 d 后可建立可靠的膝关节感染的动物模型。

参　考　文　献

[1] Fehring TK, Odum S, Griffin WL, Mason JB, et al. Nadaud M. Early failures in total knee arthroplasty[J]. Clin Orthop, 2001, 392(1): 315–315.

[2] Blomgren G, Lindgren U, et al. Late hematogenous infection in total joint replacement: studies of gentamicin and bone cement in the rabbit[J]. Clin Orthop, 1981, 155(3): 244–248.

[3] 吴宇黎，王继芳，卢世璧，等. 人工关节假体感染动物模型的建立[J]. 中华骨科杂志，1999，19(4)：236–238.

[4] 王子明，邢叔星，王爱民，等. 人工股骨头置换和术后感染模型的建立[J]. 创伤外科杂，2007，9(1)：16–19.

[5] Sheehan E, McKenna J, Mulhall K J, et al. Adhesion of Staphylococcus to orthopaedic metals, an in vivo study[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2004, 22 (1): 39–43.

[6] Matthew R. Craig, Kornelis A. Poelstra, et al. J. Christopher Sherrell. A novel total knee arthroplasty infection model in rabbits[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2005, 23(5): 1100–1104.

[7] Glenys A, Winston L H, Melvyn C K, et al. Transgenic human CRP is not pro–atherogenic, pro–thrombotic or pro–inflammatory in apoE–/–mice [J]. Atherosclerosis, 2008, 196(1): 248–255.

（责任编辑：关蕴良）