

УДК 616.72-089.844-77-06-022-078.088-02

УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКТОР ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ СУСТАВОВ

Лямцева А.К., Костюк С.А., Полуян О.С., Бенько А.Н.

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Одним из серьезных осложнений после эндопротезирования суставов является перипротезная инфекция (ППИ). Ведущая роль в развитии данной инфекции отводится микроорганизмам, которые образуют на поверхности эндопротеза микробные биопленки. Методом ПЦР-РВ исследован биологический материал 158 пациентов с признаками ППИ (основная группа) и 60 пациентов, у которых данные признаки отсутствовали (контрольная группа) после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава. Была определена частота выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов с количественным форматом детекции микроорганизмов, проведена оценка распространенности генов антибиотикорезистентности и биопленкообразования микроорганизмов. На основании исследований установлено, что выявление в синовиальной жидкости и фрагментах синовиальной оболочки и хряща ДНК *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterobacteriaceae* у пациентов с клиническими признаками инфекции является микробиологическим этиологическим фактором ППИ. Наличие генов *ica* служит генетическим маркером биопленкообразования у микроорганизмов рода *Staphylococcus*.

Ключевые слова: эндопротезирование; коленный сустав; тазобедренный сустав; перипротезная инфекция; условно-патогенные микроорганизмы.

Введение. Эндопротезирование суставов является высокоэффективной процедурой для облегчения боли и повышения качества жизни. Несмотря на высокий уровень успешности процедуры, существует вероятность возникновения опасных для жизни осложнений, таких как сосудистые и нервные повреждения, повторные операции, перипротезные переломы и вывихи, а также перипротезная инфекция (ППИ) суставов [1].

ППИ является серьезным осложнением после эндопротезирования суставов. Частота составляет 1–3 % у пациентов после первичного эндопротезирования и 4–6 % у пациентов после ревизионного эндопротезирования [2]. Инфекция часто приводит к многократным операциям, длительной антибиотикотерапии и ряду социальных, экономических и психологических последствий для пациента.

Грамположительные бактерии (особенно *Staphylococcus spp.*) наиболее часто выявляемые микроорганизмы, в последние годы было описано увеличение инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями [3]. Еще одной проблемой сегодня является растущее развитие устойчивости к противомикробным лекарственным препаратам среди микроорганизмов, что влияет на выбор антибактериального препарата или стратегии лечения [4]. Более того, полимикробная инфекция, часто недооцениваемая из-за технических ограничений и конструирующего роста в бактериальных посевах,

представляет собой дополнительную проблему в понимании течения некоторых резистентных инфекций. Наличие биопленки как существенного патогенного фактора также является важным вопросом для выбора методов микробиологической диагностики ППИ.

Цель исследования – изучить спектр бактериальных возбудителей, включающих условно-патогенные и облигатно-патогенные микроорганизмы у пациентов с перипротезной инфекцией после эндопротезирования коленного, тазобедренного сустава; оценить наличие генов микроорганизмов, участвующих в формировании биопленки, а также генов антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. В основную группу исследования были включены 158 пациентов с подозрением на ППИ после эндопротезирования коленного или тазобедренного сустава. Наибольшую группу составили пациенты с ППИ тазобедренного сустава – 95 (60,1 %, ДИ: 52,0–67,8 %) наблюдений; пациенты с ППИ коленного сустава в 63 (39,9 %, ДИ: 32,2–48,0 %) наблюдений. Контрольную группу составили 60 пациентов без подозрения на ППИ после эндопротезирования коленного, тазобедренного суставов.

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие: синовиальной жидкости и фрагментов синовиальной оболочки и хряща. Для получения образцов из полости суставов использовали разработанную методи-

ку артроскопической синовиальной биопсии, трепан-биопсии коленного/тазобедренного сустава из минимально-инвазивных доступов под контролем электронно-оптического преобразователя (ЭОП) навигации. Синовиальную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, фрагменты синовиальной оболочки и хряща в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре –20 °С.

Выделение ДНК из синовиальной жидкости проводили с использованием набора «АртДНК Легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выделения ДНК из фрагментов синовиальной оболочки и хряща применяли предварительную гомогенизацию в течение трех минут (частота 10/с) с участием гомогенизатора «TissueLyser II» (Qiagen) с последующей экстракцией набором «АртСпин» («АртБиоТех»).

ПЦР-РВ исследования по выявлению и количественному определению ДНК условно-патогенной микроорганизмов рода *Staphylococcus spp.*, рода *Streptococcus spp.* и семейства *Enterobacteriaceae* проводили с применением набора реагента «АмплиПрайм Флороскрин» («АмплиПрайм», РФ). Набор реагентов «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» («АмплиСенс», РФ) использовался для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* и метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* Качественное выявление и дифференциальную диагностику семейства *Enterobacteriaceae* (выявление ДНК *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Enterococcus faecalis/faecium*), а также *Pseudomonas aeruginosa* проводили с использованием набора реагентов «Септоскрин» («Литех», РФ).

Для изучения спектра облигатно-патогенных микроорганизмов были выбраны – *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, как одни из часто выявляемых артритогенных возбудителей при воспалительной артропатии суставов. Полученную ДНК использовали для постановки ПЦР-РВ с применением наборов реагентов «АртТест Хламидия», «АртТест Микоплазма Н»,

«АртТест Микоплазма G» («АртБиоТех») и «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydia pneumoniae*» («АмплиСенс», РФ). Амплификацию проводили на термоциклере «Rotor-Gene-3000» («Corbett research», Австралия).

Детекция молекулярных детерминант устойчивости к антимикробным препаратам – генов антибиотикорезистентности – осуществлялась набором реагентов «Резистом комплекс ESKAPE-V» («Литех», РФ). Амплификацию проводили на термоциклере «SLAN-96P» («Sansure Biotech», Китай).

Наличие генов биопленкообразования – *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* (*Staphylococcus spp.*), *papC* (*Escherichia coli*), *fimH* (*Klebsiella pneumoniae*) определяли методом полимеразной цепной реакции. Для амплификации использовали следующие последовательности: *icaA*-прямой-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA, *icaA*-обратный-TCAGGCACTAACATCCAGCA (фрагмент 188 п.н.); *icaD*-прямой-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG, *icaD*-обратный-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA (фрагмент 198 п.н.); *icaB*-прямой-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA, *icaB*-обратный-ATGGCT-TAAA-GCACACGACGC (фрагмент 526 п.н.); *icaC*-прямой-TATCGGCATCTGGTGTGACAG, *icaC*-обратный-ATCATCGTGACACACTACTAACG (фрагмент 934 п.н.); *papC*-прямой- GACGGCT-GTACTGCAGGGTGTGGCG, *papC*-обратный-ATATCCTTTCTGCAGGGGATGCAATA (фрагмент 328 п.н.); *fimH*-прямой-TGTTAC-CACCCTGCTGCTG, *fimH*-обратный-CAC-CACGTCGTTCTTGGCGT (фрагмент 512 п.н.).

В состав амплификационной смеси были включены: 12,5 мкл ArtMix; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций прямого и обратного праймеров (100 мкМ); 1,0 мкл красителя ZuberGreen; 8,5 мкл деионизированной воды, 1 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 94°C – 5 мин; 30 циклов: 1 мин – 93°C, 30 с – 55°C (для генов *icaABCD*), 61°C (для гена *fimH*), 1 мин – 65°C (для гена *papC*), 1 мин – 68°C; 10 мин – 68°C («Rotor-Gene-3000» («Corbett research», Австралия)).

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 1% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Длину амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса «DNA Ladder 100+ kb» («Евроген», РФ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 («StatSoft», США). Количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием показателей асимметрии и эксцесса, W-критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова) и представлены в виде значений медианы (Me) и процентилей (Q_{25}/Q_{75}). Для сравнения количественных показателей в исследуемых группах применялся U-критерий Манна-Уитни. Анализ категориальных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера в таблице сопряженности 2 x 2. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту – долю (%) от общего числа случаев и 95 доверительный интервал (95% ДИ) методом Клоппера–Пирсона.

Результаты и их обсуждение. При изучении видового состава условно-патогенных микроорганизмов установлена частота их выявления в синовиальной жидкости и фрагментах синовиальной оболочки у исследуемых пациентов метом ПЦР-РВ (табл. 1).

Анализ результатов выявления ДНК микроорганизмов в образцах исследуемых суставов показал, что грамположительные бактерии доминируют в качестве этиологического

фактора ППИ тазобедренного и коленного суставов, это подтверждается преимущественным выявлением ДНК *Staphylococcus spp.*, в том числе ДНК *Staphylococcus aureus* и ДНК коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* встречались с одинаковой частотой 32,3 %, ДИ: 21,2–45,1 % (n = 21) и 30,8, 95 % ДИ: 19,9–43,4 % (n = 20) случаев соответственно.

В 21 образцах биологического материала основной группы пациентов выявленные возбудители присутствовали в составе полимикробной инфекции: ДНК *Staphylococcus spp.* + *Streptococcus spp.* – в 15 образцах (71,4, 95 % ДИ: 47,8–88,7 %), ДНК *Staphylococcus spp.* + *Enterobacteriaceae* были выявлены в 6 образцах (28,6, 95 % ДИ: 11,3–52,2 %), что дает основание предполагать, что они формируют биологические сообщества в виде биопленок. Бактериальные биопленки обеспечивают превосходную и стабильную среду гомеостаза, она предотвращает попадание иммунных клеток и противобактериальных лекарственных препаратов в сообщество бактериальной биопленки.

С применением статистического анализа (точный критерий Фишера) установлено: выявление ДНК условно-патогенным микроорганизмов рода *Staphylococcus* (p < 0,05), *Streptococcus* (p = 0,0002) и семейства *Enterobacteriaceae* (p = 0,0126) в биологическом материале пациентов достоверно ассоциировано с наличием ППИ после эндопротезирования крупных суставов. Установлено наличие до-

Таблица 1 – Результаты выявления условно-патогенных возбудителей ППИ после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава у исследуемых пациентов

Возбудитель	Основная группа (n = 158), n (95 % ДИ)	Контрольная группа (n = 60), n (95 % ДИ)
<i>Staphylococcus spp.</i>	65 (41,1; 33,8–48,9)*	2 (3,3; 0,4–11,5)
Метициллин-чувствительный <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	8 (12,3; 5,5–22,8)	0 (0,0)
Метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	13 (20,0; 11,1–31,8)	0 (0,0)
Метициллин-резистентный коагулазонегативный <i>Staphylococcus spp.</i> (MRCoNS)	20 (30,8; 19,9–43,4)	1 (50,0; 1,3–98,7)
<i>Streptococcus spp.</i>	25 (15,8; 10,5–22,5)*	0 (0,0)
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	8 (5,1; 2,2–9,7)	0 (0,0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	14 (8,9; 4,9–14,4)*	0 (0,0)
<i>Escherichia coli</i>	6 (42,9; 17,7–71,1)	0 (0,0)
<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	4 (28,6; 8,4–58,1)	0 (0,0)
<i>Proteus spp.</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Serratia spp.</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0,0)	0 (0,0)
Полимикробные [#]	21 (13,3; 8,4–19,6)*	0 (0,0)

Примечания:

1 * – различия статистически значимы.

2 # – Относится к числу случаев полимикробной ППИ: конкретные вовлеченные микроорганизмы отражены в соответствующих категориях.

стоверных отличий по частоте выявления полимикробной инфекции между основной и контрольной группой ($p = 0,0013$).

При изучении частоты выявления ДНК облигатно-патогенной флоры (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) в синовиальной жидкости и фрагментах синовиальной оболочки основной и контрольной группы были получены отрицательные результаты во всех исследуемых образцах.

На следующем этапе нами проведены молекулярно-генетические исследования по определению количественных уровней (концентраций) ДНК рода *Streptococcus spp.*, рода *Staphylococcus spp.* и семейства *Enterobacteriaceae* во всех образцах биологического материала, в которых детектировалась ДНК указанных возбудителей. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таким образом, грамположительные бактерии доминируют в качестве этиологического фактора ППИ тазобедренного и коленного суставов, это подтверждается преимуществен-

ным выявлением ДНК *Staphylococcus spp.*, далее следуют микроорганизмы рода *Streptococcus* и представители семейства *Enterobacteriaceae*. Частоты выявления *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативных видов *Staphylococcus spp.* при ППИ тазобедренных и коленных суставов относительно равна, когда эти исследования оцениваются в совокупности, но, возможно, различаются в определенных частных ситуациях в зависимости от пути заражения и времени инициации воспаления после эндопротезирования.

Проведена идентификация генов антибиотикорезистентности в клинических образцах для оценки вирулентности условно-патогенных бактерий, данные представлены в табл. 3.

Генетическое нацеливание на бактериальные гены, вызывающие лекарственную устойчивость, имеет важное значение для своевременной коррекции антимикробной терапии.

Проведена идентификация молекулярных факторов патогенности у микроорганизмов и установление генетических маркеров, ассоциированных с биопленкообразованием

Таблица 2 – Количественные данные определения концентраций ДНК *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterobacteriaceae* в биологическом материале основной группы исследования

Биологический материал	Концентрация ДНК <i>Staphylococcus spp.</i> , Ме (Q_{25}/Q_{75}) копий/мл			Концентрация ДНК <i>Streptococcus spp.</i> , Ме (Q_{25}/Q_{75}) копий/мл	Концентрация ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> , Ме (Q_{25}/Q_{75}) копий/мл
	MSSA	MRSA	MRCoNS		
Фрагменты синовиальной оболочки и хряща	6,12 (5,40/8,71) $\times 10^4$			6,20 (5,19/7,62) $\times 10^3$	7,16 (6,01/8,34) $\times 10^3$
	8,37 (6,98/9,72) $\times 10^3$	7,12 (6,26/8,23) $\times 10^3$	9,43 (8,13/10,59) $\times 10^3$		
Синовиальная жидкость	4,80 (3,27/5,91) $\times 10^3$			5,49 (4,43/7,09) $\times 10^2$	6,82 (5,08/7,35) $\times 10^3$
	7,20 (6,24/8,09) $\times 10^2$	7,51 (6,34/8,32) $\times 10^2$	8,18 (7,64/9,28) $\times 10^3$		

Таблица 3 – Результаты выявления генов антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий, участвующих в этиологии ППИ

Микроорганизм/Антибиотик	Ген устойчивости	Присутствие гена, n (95 % ДИ)
<i>Staphylococcus aureus</i> u <i>Staphylococcus spp.</i> (n = 65)		
Бета-лактамы	<i>mecA</i>	39 (60,0; 47,1–72,0)
<i>Escherichia coli</i> (n = 6)		
Цефалоспорины	<i>blaCTX-M</i>	0 (0,0)
	<i>blaOXA10</i>	2 (33,3; 4,3–77,7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Enterobacter spp.</i> (n = 4)		
Карбапенемы	<i>blaKPC</i>	0 (0,0)
	<i>blaOXA48-like</i>	0 (0,0)
Пенициллины	<i>blaGES</i>	1 (25,0; 0,6–80,6)
Цефалоспорины	<i>blaDHA</i>	0 (0,0)
<i>Streptococcus spp.</i> (n = 25)		
Макролиды, линкозамиды, стрептограмин В	<i>Mef</i>	6 (24,0; 9,4–45,1)
	<i>ErmB</i>	2 (8,0; 1,0–26,0)
<i>Enterococcus faecalis</i>/<i>Enterococcus faecium</i> (n = 8)		
Гликопептиды	<i>VanA</i> / <i>VanB</i>	0 (0,0)

у бактерий, участвующих в этиологии перипротезной инфекции. Молекулярное обнаружение генов *ica* выявило наличие оперона в большинстве клинических штаммов (28 из 41; 68,3 %, ДИ: 51,9–81,9 %). Обнаружено статистически значимое выявление генов *ica* у штаммов *Staphylococcus aureus* ($n = 20$, 95,2 %; ДИ: 76,2–99,9 %) по сравнению со штаммами коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* ($n = 13$, 65,0 %; ДИ: 40,8–84,6 %) из клинических образцов ($p = 0,02$). 7 штаммов коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* не несли оперон *ica*, однако это не исключает фенотипической способности штаммов образовывать биопленку и предполагает существование *ica*-независимых механизмов биопленкообразования. Референс-штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 характеризовался наличием генов *ica* оперона (*icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*). Наличие генов *ica* служит генетическим маркером биопленкообразования у микроорганизмов рода *Staphylococcus*, участвующих в этиологии перипротезной инфекции.

Ген *papC* детектирован у 4 штаммов *Escherichia coli* (66,7 %; ДИ: 22,3–95,7 %) из клинических образцов, у референс-штамма *Escherichia coli* ATCC 11229 ген не обнаружен ($p = 0,43$).

Штамм *Klebsiella pneumoniae* из клинического образца характеризовался наличием гена *fimH*, в то время как у референс-штамма *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 данный ген не выявлен. Достоверных отличий не установлено ($p = 1,00$).

Заключение. На основании исследований установлено, что условно-патогенные микроорганизмы являются статистически значимым этиологическим фактором ППИ после эндопротезирования крупных суставов. Ведущую роль в развитии ППИ играет *Staphylococcus spp.* ($n = 65$), доля которого 41,1, 95 % ДИ: 33,8–48,9 %, на долю *Streptococcus spp.* ($n = 25$) – 15,8 %, 95 % ДИ: 10,5–22,5% случаев и *Enterobacteriaceae* ($n = 14$) – 8,9 %, 95 % ДИ: 4,9–14,4 % случаев. В 13,3 %, 95 % ДИ: 8,4–19,6 % ($n = 21$) случаев у исследуемых пациентов выявленные возбудители присутствовали в составе полимикробной инфекции: ДНК *Staphylococcus spp.* + *Streptococcus spp.* – в 15 образцах (71,4 %, 95 % ДИ: 47,8–88,7 %), ДНК *Staphylococcus spp.* + *Enterobacteriaceae* выявлены в шести образцах (28,6 %, 95 % ДИ: 11,3–52,2 %).

При оценке наличия и распространенности генов биопленкообразования у условно-патогенных возбудителей, ассоциированных с ППИ, установлено, что у микроорганизмов рода *Staphylococcus* наличие генов *ica* служит генетическим маркером биопленкообразования. Обнаружена устойчивость к бета-лактамам у *Staphylococcus spp.* (60,0 %, 95 % ДИ: 47,1–72,0 %), цефалоспорином у *Escherichia coli* (33,3 %, 95 % ДИ: 4,3–77,7), пенициллинам у *Klebsiella pneumoniae/Enterobacter spp.* (25,0 %, 95 % ДИ: 0,6–80,6 %), макролидам/линкозамидам/стрептограмину В у *Streptococcus spp.* (32,0 %, 95 % ДИ: 14,9–53,5 %).

Список цитированных источников

1. Frank, R.M. Periprosthetic joint infection: modern aspects of prevention, diagnosis, and treatment / R.M. Frank, M.B. Cross, C.J. Della Valle // J. Knee Surg. – 2015. – Vol. 28, iss. 2. – P. 105–112. DOI: 10.1055/s-0034-1396015.
2. Detecting the Presence of Bacterial DNA and RNA by Polymerase Chain Reaction to Diagnose Suspected Periprosthetic Joint Infection after Antibiotic Therapy / X.Y. Fang, W.B. Li, C.F. Zhang [et al.] // Orthop. Surg. – 2018. – Vol. 10, iss. 1. – P. 40–46. DOI: 10.1111/os.12359.
3. Time trends in the a etiology of prosthetic joint infections: a multicentre cohort study / N. Benito, M. Franco, A. Ribera [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Vol. 22, iss. 8. – P. 732.e1–732.e8. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.05.004.
4. Orthopedic Implant-Associated Infection by Multidrug Resistant Enterobacteriaceae / B.G. Pfang, J. García-Cañete, J. García-Lasheras [et al.] // J. Clin. Med. – 2019. – Vol. 8, iss. 2. – P. 220. DOI: 10.3390/jcm8020220.

OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS – ETIOLOGICAL FACTOR PERIPROSTHETIC JOINT INFECTION

Lyamtseva A.K., Kostiuk S.A., Poluyan O.S., Benko A.N.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

One of the serious complications after endoprosthesis replacement is periprosthetic joint infection (PJI). The leading role in the development of this infection is given to microorganisms that form microbial biofilms on the surface of the endoprosthesis. The biological material of 158 patients with signs of PJI (main group) and 60 patients who did not have these signs (control group) after hip/knee joint replacement was studied using the RT-PCR method. The frequency of detection of DNA of opportunistic microorganisms with a quantitative format for detecting microorganisms was determined, the prevalence of antibiotic resistance genes and biofilm formation of microorganisms was assessed. Based on the studies, it was established that the detection of *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* and *Enterobacteriaceae* DNA in synovial fluid and fragments of the synovial membrane and cartilage in patients with clinical signs of infection is a microbiological etiological factor of PJI. The presence of *ica* genes serves as a genetic marker of biofilm formation in microorganisms of the genus *Staphylococcus*.

Keywords: endoprosthesis replacement; knee joint; hip joint; periprosthetic joint infection; opportunistic microorganisms.