

Р. А. Зубавленко, И. В. Бабушкина, В. Ю. Ульянов, И. А. Норкин, А. С. Бондаренко

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ БИОПЛЕНОЧНЫХ (СЕССИЛЬНЫХ) ИМПЛАНТАТ- АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ КОЛЕННЫХ СУСТАВОВ

ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Россия, 410002, Саратов, ул. Чернышевского, д. 148

R. A. Zubavlenko, I. V. Babushkina, V. Yu. Ulyanov, I. A. Norkin, A. S. Bondarenko

FEATURES OF DIAGNOSTICS OF BIOFILM (SESSION) IMPLANT-ASSOCIATED INFECTIOUS COMPLICATIONS OF KNEE ARTHROPLASTY

V. I. Razumovsky Federal State Budgetary Institution Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health of the Russian Federation (FSBI «SarNIITO» of the Ministry of Health of Russia). 148, Chernyshevsky str., Saratov, 410002, Russia

Резюме

Особенности патогенеза парапротезных инфекционных осложнений, связанных с ведущей ролью сессильных форм возбудителей, определяют необходимость изменения методологических подходов к диагностике перипротезной инфекции. Проведен анализ результатов микробиологического исследования 357 образцов биологического материала, полученного от 104 пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией после первичного эндопротезирования коленного сустава. Среди возбудителей перипротезной инфекции отмечено преобладание грамположительных кокков (68,4%). Частота ассоциатов микроорганизмов в этиологической структуре имплантат-ассоциированной инфекции составила 32,3–54,1%. Наиболее информативные методы диагностики перипротезной инфекции связаны с механической или ультразвуковой деструкцией биопленки. Для проведения рациональной этиотропной терапии имплантат-ассоциированной инфекции необходимо учитывать возможную стимуляцию биопленкообразования низкими дозами антибиотиков и нарушением режима антибиотикотерапии, что способствует хронизации инфекционно-воспалительного процесса.

Abstract

The features of the pathogenesis of paraprosthesis infectious complications associated with the leading role of sessile forms of pathogens determine the need to change methodological approaches to the diagnosis of periprosthetic infection. The results of microbiological examination of 357 samples of biological material obtained from 104 patients with implant-associated infection after primary knee replacement were analyzed. Among the pathogens of periprosthetic infection, the predominance of gram-positive cocci was noted (68,4%). The frequency of microbial associates in the etiological structure of implant-associated infection was 32,3–54,1%. The most informative methods of diagnosis of periprosthetic infection are methods associated with mechanical or ultrasonic destruction of biofilm. For rational etiotropic therapy of implant-associated infection, it is necessary to take into account the possible stimulation of biofilm formation with low doses of antibiotics and violation of the regime of antibiotic therapy, which contributes to the chronization of the infectious and inflammatory process.

Ключевые слова: эндопротезирование суставов, перипротезная инфекция, микробиологическое исследование, биопленка.

Для цитирования: Зубавленко Р. А., Бабушкина И. В., Ульянов В. Ю., Норкин И. А., Бондаренко А. С. Особенности диагностики биопленных (сессильных) имплантат-ассоциированных инфекционных осложнений эндопротезирования коленных суставов // *Quantum Satis*. 2022; 1–2 (5): 56–59.

Keywords: joint replacement, periprosthetic infection, microbiological examination, biofilm.

For citation: Zubavlenko R. A., Babushkina I. V., Ulyanov V. Yu., Norkin I. A., Bondarenko A. S. Features of diagnostics of biofilm (session) implant-associated infectious complications of knee arthroplasty // *Quantum Satis*. 2022; 1–2 (5): 56–59.

В верификации имплантат-ассоциированной инфекции после эндопротезирования крупных суставов ведущая роль принадлежит микробиологическим методам, однако особенности патогенеза парапротезных инфекционных осложнений, связанные с ведущей ролью сессильных форм возбудителей, определяют необходимость изменения методологических подходов к диагностике перипротезной инфекции [1, 3].

Адгезия микроорганизмов на биогенных и абиогенных поверхностях с возникновением биопленки приводит к снижению метаболизма и замедлению роста бактерий с формированием высокой резистентности к факторам гуморального и клеточного иммунитета, а также применяемым антибиотикам и антисептикам. Методики бактериологического исследования, используемые в настоящее время, адаптированы к планктонной форме микроорганизмов и в большинстве случаев не обладают информативностью в отношении возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции [2, 4–7].

Материалы и методы

Проведен анализ результатов микробиологического исследования 357 образцов биологического материала, полученного от 104 пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией после первичного эндопротезирования коленного сустава. Средний возраст пациентов составил $61,3 \pm 7,4$ года (38,3% мужчин и 61,7% женщин). Лечение проводилось в НИИТОН СГМУ им. В. И. Разумовского в 2017–2019 гг.

На этапе дооперационной диагностики осуществляли взятие биологического материала из ран и аспирата из полости сустава с высевом на жидкие и твердые дифференциально-диагностические питательные среды.

Гомогенизированные тканевые биоптаты получали на этапе интраоперационной диагностики (3–5 образцов), помещали в одноразовый стерильный контейнер, взвешивали и гомогенизировали. Для количественного исследования готовили разведения биоматериала и мерно высевали на плотные питательные среды. Исследование соникационной жидкости (СЖ) с компонентов удаленного эндопротеза осуществляли обработкой компонентов эндопротеза в стерильном пакете с раствором 0,9%

NaCl с помощью ультразвуковой установки «УЗУМИ-2» при 37 кГц в течение 10 минут, после чего СЖ высевали для культурального исследования.

Микробиологическое исследование проводили в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535, микроорганизмы идентифицировали с использованием анализатора BD BBL™ Crystal™ AutoReader (Becton Dickinson, США). Способность к формированию биопленок анализировали методом оценки адгезивной активности и определения биомассы биопленки, разработанным G. D. Christensen. Количественную оценку полученных спиртовых экстрактов красителя проводили на спектрофотометре (Anthos 2020, Австрия) при длине волны 540 нм.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Statistica 10.0. Использовали непараметрические методы исследования с вычислением медианы (Me), 25-го и 75-го квартилей (Q). Для сравнения трех выборок использовали непараметрический дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Среди возбудителей перипротезной инфекции отмечено преобладание грамположительных кокков (68,4%), в том числе представителей рода *Staphylococcus* (67,1%), из них 42,8% выделенных штаммов относилось к коагулазопозитивным (*S. aureus*).

Среди представителей грамотрицательной флоры наиболее часто встречались микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (17,5% штаммов), в основном *E. coli* (10,2%) и *Enterobacter* spp. (8,3%). Неферментирующие грамотрицательные бактерии были выделены в 14,1% случаев, среди них штаммы *Ps. aeruginosa* составляли 10,1%, *Acinetobacter* spp. – 4,0%.

Определена частота ассоциатов микроорганизмов в этиологической структуре имплантат-ассоциированной инфекции, которая составила 32,3–54,1%. Ассоциаты характеризовались различным комбинационным составом и широким видовым спектром входящих в них микроорганизмов (более 30 видов). Подсчитан коэффициент ассоциативности (отношение количества штаммов данного вида в составе ассоциатов к общему числу выделенных

штаммов этого вида), составивший для *Staphylococcus* spp. 32,5–47,6%, для энтеробактерий – 39,0–45,4%, неферментирующих грамотрицательных бактерий – 78,6–89,5%, дрожжеподобных грибов рода *Candida* – 97,3%.

Сравнение антибиотикорезистентности возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции, выделенных в составе ассоциатов и в виде моновозбудителя, позволило установить, что удельный вес метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus* spp. (MRS), полирезистентных неферментирующих грамотрицательных бактерий и энтеробактерий был достоверно ($p < 0,001$) выше среди ассоциантов (42,1%, 78,4%, 54,8% соответственно), чем среди возбудителей инфекционных осложнений, представленных в виде монокультуры (23,7%, 43,9%, 32,8% соответственно).

Микробиологическое исследование отделяемого из ран в диагностике перипротезной инфекции обладает низкой чувствительностью и специфичностью (67% и 61% соответственно). Выделение этиологического агента из аспирата также не обладает достаточной информативностью в связи с тем, что возбудители имплантат-ассоциированной инфекции часто формируют биопленки в костно-эндопротезном пространстве и бактериальные клетки не контактируют с синовиальной жидкостью. Наиболее информативные методы диагностики перипротезной инфекции связаны с механической или ультразвуковой деструкцией биопленки, являющейся основной формой существования возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции.

Микробиологическое исследование гомогенизированных тканевых биоптатов обладает достаточной чувствительностью (84,55%) и специфичностью (93,5%) при диагностике перипротезной инфекции. Кроме того, нами начато использование метода микробиологического исследования соникационной жидкости после ультразвуковой обработки удаленных компонентов эндопротеза, который также обладает высокой чувствительностью (94,5%) и специфичностью (93,75). Высокая информативность метода связана с разрушением полисахаридного слоя биопленки и дезинтеграцией бактериальных клеток.

Изучена способность к формированию микробных биопленок представителей рода *Staphylococcus*: в исследовании включены 38 клинических штаммов, выделенных у пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией, и референсные штаммы – *S. epidermidis* (ATCC 12228) и *S. aureus* (ATCC 25923, MRSA 43300). Способность к формированию биопленок была выявлена у 68,3% клинических штаммов. У 15 штаммов *S. epidermidis* значения оптической плотности экстрактов кристаллического фиолетового составили 0,527 (0,429; 0,618), у 12 штаммов *S. aureus* – 0,689 (0,574; 0,718), что свидетельствует о высокой пленкообразующей способности. Показатели оптической плотности элюатов красителей клинических штаммов были достоверно ($p < 0,001$) выше результатов, полученных при исследовании референсных штаммов.

Межвидовых различий между представителями рода *Staphylococcus* выявлено не было.

Также была исследована способность к формированию биопленок клинических штаммов *Staphylococcus* spp. в зависимости от биологического материала, из которого они были выделены. Отмечено, что для штаммов как коагулазоположительных, так и коагулазонегативных стафилококков из гомогенизированных биоптатов мягких тканей и соникационной жидкости, полученной после ультразвуковой обработки удаленных компонентов эндопротезов, была характерна высокая способность к биопленкообразованию, достоверно превышающая значения для штаммов, выделенных из поверхностных ран и аспирата ($p < 0,05$).

Изучена способность к формированию биопленок у грамотрицательных бактерий, выделенных из различного биологического материала пациентов с перипротезной инфекцией после эндопротезирования коленного сустава. Способность к формированию биопленок у неферментирующих грамотрицательных бактерий статистически достоверно ($p < 0,05$) превышала пленкообразующую способность энтеробактерий (*E. coli*, *Enterobacter* spp.). Обнаружены различия в кинетике формирования биопленок грамотрицательных бактерий: для энтеробактерий были характерны созревание и начало дисперсии биопленок после 48 часов инкубации, а у неферментирующих грамотрицательных бактерий зафиксирована длительная фаза созревания (более 72 часов), способствующая формированию значительной массы биопленки.

Заключение

Проведен сравнительный анализ информативности методик микробиологической диагностики имплантат-ассоциированной инфекции, выделены аспекты методологии микробиологических исследований, позволяющие повысить информативность диагностики инфекционных осложнений.

Для проведения рациональной этиотропной терапии имплантат-ассоциированной инфекции необходимо учитывать возможную стимуляцию биопленкообразования низкими дозами антибиотиков и нарушением режима антибиотикотерапии, что способствует хронизации инфекционно-воспалительного процесса. Разработка альтернативных антимикробных препаратов, способных препятствовать формированию микробной биопленки и вызывать деструкцию сформированной пленки, является перспективным направлением в оптимизации лечения имплантат-ассоциированной инфекции.

Для правильной интерпретации результатов исследований необходим комплексный подход, учитывающий особенности патогенеза имплантат-ассоциированной инфекции, структуру исследуемых образцов клинического материала и методологию проведения самих бактериологических исследований.

Литература

1. Божкова С. А., Краснова М. В., Полякова Е. М. и др. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* — ведущих возбудителей ортопедической имплантат-ассоциированной инфекции // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 2 (16): 149–156.
2. Bozic K., Kurtz S., Lau E., et al. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States // Clin. Orthop. Relat. Res. 2010; 468 (1): 45–51.
3. Бабушкина И. В., Бондаренко А. С., Мамонова И. А. и др. Роль микробных ассоциаций в развитии имплантат-ассоциированной инфекции после первичного эндопротезирования коленного сустава // Саратовский научно-медицинский журнал. 2018; 14 (3): 492–497.
4. Singh A., Nicoll D. Complications and re-operation rates after revision total knee replacement // Orthopaedic Proceedings. 2013; 95 B (31).
5. Божкова С. А., Полякова Е. М., Борисов А. М., Рукина А. Н. MRSA при инфекции протезированного сустава: мишень для антибактериальной терапии // Фарматека. 2015; 4: 65–69.
6. Галашина Е. А., Бондаренко А. С., Ульянов В. Ю., Климов С. С. Роль маркеров ремоделирования скелетной ткани в патогенезе имплантат-ассоциированного воспаления после первичной артропластики коленного сустава // Саратовский научно-медицинский журнал. 2018; 14 (3): 515–518.
7. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И., Рубанов Л. Н. Динамика микробного состава хронической раны с учетом особенностей предоперационной подготовки // Проблемы здоровья и экологии. 2012; 32 (2): 108–114.

Авторы

<p>ЗУБАВЛЕНКО Роман Андреевич</p>	<p>Младший научный сотрудник отдела фундаментальных и клиничко-экспериментальных исследований, травматолог-ортопед Научно-исследовательского института травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0001-8225-1150. E-mail: 79030230027@yandex.ru</p>
<p>БАБУШКИНА Ирина Владимировна</p>	<p>Кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела фундаментальных и клиничко-экспериментальных исследований научно-исследовательского института травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0001-6740-1050</p>
<p>УЛЬЯНОВ Владимир Юрьевич</p>	<p>Доктор медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной и инновационной деятельности Научно-исследовательского института травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0002-9466-8348</p>
<p>НОРКИН Игорь Алексеевич</p>	<p>Доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела инновационных проектов в травматологии и ортопедии Научно-исследовательского института травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0002-6770-3398</p>
<p>БОНДАРЕНКО Александр Сергеевич</p>	<p>Ассистент кафедры травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «СГМУ им. В. И. Разумовского СарНИИТОН» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0001-6345-1851</p>