

## Случаи развития повторной перипротезной инфекции *Staphylococcus aureus*: реинфекция или реактивация патогена?

А.А. Кечин<sup>1,2</sup>, В.С. Боробова<sup>1,2</sup>, Т.У. Шералиев<sup>3</sup>, С.О. Кретьен<sup>3</sup>, И.Н. Троменшлегер<sup>1</sup>, В.В. Павлов<sup>3</sup>, М.Л. Филипенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

### Реферат

**Актуальность.** *Staphylococcus aureus* — один из наиболее частых возбудителей перипротезной инфекции. Несмотря на высокое генетическое разнообразие штаммов *S. aureus*, определение филогенетических связей, а следовательно, и источника заражения является непростой задачей, которая может быть решена только при подробном сравнении геномов получаемых изолятов.

**Цель** — используя полногеномное секвенирование с выявлением генетических и фенотипических отличий между изолятами, изучить возможность дифференцирования случаев заражения пациентов внутрибольничной перипротезной инфекцией с перспективой обоснованного выбора тактики лечения пациентов.

**Материал и методы.** Были определены нуклеотидные последовательности геномов 20 изолятов *S. aureus*, полученных от 13 пациентов с перипротезной инфекцией. В работе были использованы стандартные микробиологические тесты и анализ геномов *in silico* программами ResFinder, KmerFinder, spaTyper и SCCmecFinder.

**Результаты.** Применив филогенетический анализ с построением корового генома, были идентифицированы потенциальные случаи внутригоспитальной инфекции, а также исследованы случаи повторного развития инфекции. Показано родство изолятов, выделенных на протяжении 2012–2019 гг., а также эволюция их геномов с приобретением и потерей генов антибиотикорезистентности. Так, в одном из случаев повторного развития инфекции была обнаружена потеря нескольких генов за период ремиссии около 5 лет. При сравнении результатов фенотипического тестирования изолятов диско-диффузионным методом и предсказания резистентности по данным анализа генома было выявлено несоответствие для трех изолятов, содержащих ген *aac(6')-aph(2'')* и резистентных к тобрамицину и гентамицину, но чувствительных к амикацину. На основании результатов лечения нескольких случаев с повторным развитием ППИ было выдвинуто предположение, что в случае развития инфекции, вызванной мультирезистентным внутригоспитальным штаммом, более эффективным может быть проведение радикального лечения.

**Заключение.** Полногеномное секвенирование позволяет выявлять филогенетически родственные изоляты, общность генетических и фенотипических свойств которых подтверждает их родство. На фоне проводимой высокодозной антибактериальной терапии в геномах *S. aureus* накапливаются изменения, которые при молекулярно-генетическом тестировании могут помочь обосновать выбор радикальной тактики лечения перипротезной инфекции — удаление эндопротеза.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*, перипротезная инфекция, внутригоспитальная инфекция, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ, коровый геном.

 **Для цитирования:** Кечин А.А., Боробова В.С., Шералиев Т.У., Кретьен С.О., Троменшлегер И.Н., Павлов В.В., Филипенко М.Л. Случаи развития повторной перипротезной инфекции *Staphylococcus aureus*: реинфекция или реактивация патогена? *Травматология и ортопедия России*. <https://doi.org/10.17816/2311-2905-17610>.

 Кечин Андрей Андреевич; e-mail: aa\_kechin@niboch.nsc.ru

Рукопись получена: 28.10.2024. Рукопись одобрена: 20.02.2025. Статья опубликована онлайн: 18.03.2025.

© Кечин А.А., Боробова В.С., Шералиев Т.У., Кретьен С.О., Троменшлегер И.Н., Павлов В.В., Филипенко М.Л., 2025



## Recurrent Cases of Periprosthetic Joint Infection Caused by *Staphylococcus Aureus*: Reinfection or Reactivation of a Pathogen?

Andrey A. Kechin<sup>1,2</sup>, Victoria S. Borobova<sup>1,2</sup>, Taalai U. Sheraliev<sup>3</sup>, Svetlana O. Chretien<sup>3</sup>, Irina N. Tromenshleger<sup>1</sup>, Vitaliy V. Pavlov<sup>3</sup>, Maxim L. Filipenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia

### Abstract

**Background.** *Staphylococcus aureus* is one of the most common pathogens causing periprosthetic joint infection (PJI). Despite the high genetic diversity of *S. aureus* strains, determining phylogenetic relationships and, consequently, the source of infection is a challenging task that can only be addressed through detailed comparison of the genomes of the obtained isolates.

**The aim of the study** — using whole-genome sequencing with the detection of genetic and phenotypic differences between isolates, to explore the possibility of differentiating cases of hospital-acquired periprosthetic infection, with the prospect of making an informed choice of treatment tactics.

**Methods.** Genomes of 20 *S. aureus* isolates from 13 patients with PJI were sequenced. Standard microbiological tests and in silico analysis of genomes using ResFinder, KmerFinder, spaTyper, and SCCmecFinder programs were employed.

**Results.** Phylogenetic analysis based on core genome construction identified potential cases of nosocomial infections, as well as cases of recurrent infections. The relatedness of isolates collected between 2012 and 2019 was demonstrated, along with the evolution of their genomes, including the acquisition and loss of antibiotic resistance genes. In one case of recurrent infection, the loss of several genes was observed over a remission period of approximately 5 years. Comparison of phenotypic testing results using the disk diffusion method and resistance predictions based on genome analysis revealed discrepancies for three isolates containing the *aac(6')-aph(2'')* gene, which were resistant to tobramycin and gentamicin but susceptible to amikacin. Based on the treatment outcomes of several recurrent PJI cases, it was hypothesized that radical treatment might be more effective in cases of infections caused by multidrug-resistant nosocomial strains.

**Conclusion.** Whole-genome sequencing enables the identification of phylogenetically related isolates, with shared genetic and phenotypic properties confirming their relatedness. Against the backdrop of high-dose antibacterial therapy, *S. aureus* genomes accumulate changes that, through molecular genetic testing, may help to justify the choice of radical treatment strategy for periprosthetic joint infection, such as implant removal.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, periprosthetic joint infection, hospital-acquired infection, whole-genome sequencing, phylogenetic analysis, core genome.

---

**Cite as:** Kechin A.A., Borobova V.S., Sheraliev T.U., Chretien S.O., Tromenshleger I.N., Pavlov V.V., Filipenko M.L. Recurrent Cases of Periprosthetic Joint Infection Caused by *Staphylococcus Aureus*: Reinfection or Reactivation of a Pathogen?. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. (In Russian). <https://doi.org/10.17816/2311-2905-17610>.

✉ Andrey A. Kechin; e-mail: aa\_kechin@niboch.nsc.ru

Submitted: 28.10.2024. Accepted: 20.02.2025. Published online: 18.03.2025.

© Kechin A.A., Borobova V.S., Sheraliev T.U., Chretien S.O., Tromenshleger I.N., Pavlov V.V., Filipenko M.L., 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Перипротезные инфекции (ППИ) являются наиболее опасной разновидностью послеоперационных осложнений первичного эндопротезирования крупных суставов, приводя к значительной потере функциональных возможностей замененного сустава, вплоть до летального исхода [1, 2]. Своевременная диагностика и оценка факторов риска развития ППИ может помочь избежать подобных осложнений или выбрать оптимальный алгоритм их устранения. Так, одним из важнейших факторов, определяющих последующую тактику антибиотикотерапии пациента, является природа возбудителя и его характеристики, включая чувствительность к различным антимикробным препаратам. Среди возбудителей ППИ чаще других встречаются изоляты рода стафилококков (*Staphylococcus* spp.), преобладающим из которых является золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) [3, 4, 5]. Важным для клиники является выявление источника заражения, который может быть обусловлен контаминацией во время операции, гематогенным распространением возбудителя, рецидивом предыдущей инфекции или контактным распространением возбудителя из локального очага. В каждом из этих случаев может меняться течение заболевания, ответ на антибиотикотерапию и, как следствие, исход лечения [6]. В большинстве описанных в литературе исследований не был определен источник повторной инфекции, из-за чего до сих пор механизмы развития реинфекции остаются малоизученными. Так, во многих работах вывод о том, что повторная инфекция вызвана тем же микроорганизмом делается исключительно на основании принадлежности бактерии к тому же виду стандартными микробиологическими тестами [7, 8]. Однако ввиду высокого генетического разнообразия штаммов *S. aureus* для точной дифференциации двух изолятов требуется более глубокое молекулярно-генетическое исследование их геномов [9].

В последние годы все чаще для исследования изолятов *S. aureus*, вызывающих ППИ, применяется полногеномное секвенирование (whole-genome sequencing — WGS), позволяющее определять сразу множество клинически значимых характеристик. Так, с помощью полногеномного секвенирования возможно определить филогенетическое родство двух изолятов, наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности [10], а также предсказать опасность штамма по содержанию в геноме генов, кодирующих различные факторы вирулентности [11]. Помимо перечисленных клинически важных характеристик, которые могут повлиять на последующую терапию пациента, данные полногеномного секвенирования могут помочь расширить фундаментальные

представления о течении заболевания. Так, сравнение геномов родственных изолятов, например после реактивации первичной инфекции, может позволить предположить новые характеристики штамма на основании приобретенных в результате горизонтального переноса генов или точечных мутаций. Для этого необходимо накопление, с одной стороны, достаточной статистики о связи различных молекулярно-генетических характеристик штаммов с патогенными свойствами возбудителя инфекции, а с другой — подробное исследование новых выявляемых факторов вирулентности и антибиотикорезистентности. Именно такое глубокое изучение проблем ППИ поможет разработать новые пути борьбы и профилактики данного вида послеоперационных осложнений [12].

*Цель* — используя полногеномное секвенирование с выявлением генетических и фенотипических отличий между изолятами, изучить возможность дифференцирования случаев заражения пациентов внутрибольничной перипротезной инфекцией с перспективой обоснованного выбора тактики лечения пациентов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Изоляты бактерий

С 2012 по 2019 г. в Новосибирском институте травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна для полногеномного исследования были собраны 20 изолятов *S. aureus* от 13 пациентов, проходивших лечение ППИ после эндопротезирования тазобедренного сустава. Для пяти пациентов было получено от двух до трех изолятов в связи с развитием повторной ППИ после проведенного лечения. Для выявления этиологически значимых микроорганизмов были использованы стандартные культуральные методы с использованием питательных сред (основа кровяного агара с бараньей кровью, шоколадный агар, агар Шедлера). Идентификация выделенных микроорганизмов производилась с помощью анализатора VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, Франция) с применением карт Vitek ID-GP, карт для определения чувствительности Vitek AST-GP67, а также системы для идентификации стафилококков и микрококков API STAPH (bioMérieux, Франция). В 2021 г. после заключения договора об идентификации микроорганизмов с помощью масс-спектрометрии с ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России видовая принадлежность выделенных изолятов была валидирована. Бактериальные культуры хранились при -80°C в среде Лурия-Бертани с добавлением 30% глицерола.

Помимо карт Vitek AST-GP67, чувствительность к антибиотикам оценивалась с помощью стандартного диско-диффузионного метода [13]. Для постановки антибиотикограмм диско-диффузионным методом использовались диски

с цефокситином (для выявления метициллино-резистентности), рифампицином, линезолидом, триметоприм-сульфаметоксазолом, левофлоксацином, цiproфлоксацином, тигециклином, гентамицином, амикацином, эритромицином, тетрациклином, клиндамицином (Bio-Rad, США). Критерии чувствительности были заданы на основании Российских клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам»\*, подготовленных на основе документов EUCAST Европейского комитета по определению чувствительности. Для каждого пациента были собраны дата госпитализации, диагноз и список антибиотиков, применявшихся для лечения ППИ.

### Выделение ДНК

Для выделения ДНК из полученных чистых культур *S. aureus* 50 мл клеточной культуры центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин. Осадки ресуспендировали в 180 мкл 0,15 M NaCl, после чего добавляли 200 мкг лизоцима (AppliChem, Германия) и 50 мкг РНКазы (SERVA, США) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого добавляли 600 мкл буфера для лизиса (300 mM NaAc; pH = 5,4; 40% гуанидин тиоцианат; 0,05% мочевины; 5% тритон X-100; 0,1% додецилсульфат натрия), перемешивали и инкубировали смесь при 65°C в течение 10 мин. Далее полученный лизат переносили в спин-колонки для выделения ДНК/РНК (БиоФармЭксперт, Россия), центрифугировали 5 мин. при 13 000 g, осаждали ДНК на колонке с помощью 50% изопропанола с 10 mM Трис-НСl (pH = 8,0) и очищали с помощью 80% этанола. ДНК смывали с колонки добавлением 100 мкл 10 mM Трис-НСl (pH = 8,0) на центр мембраны, инкубировали при 65°C в течение 10 мин. и центрифугировали при 8000 g 2 мин. Чистоту и количество ДНК оценивали спектрофотометрически по соотношению A260/A280 и значению A260. Образцы выделенной ДНК хранили при -20°C.

### Полногеномное секвенирование

Для проведения полногеномного секвенирования 100 нг образца ДНК фрагментировали с помощью ультразвука и готовили библиотеку для секвенирования по протоколу, описанному ранее [14]. Для этого восстанавливали концы фрагментов с использованием 5 е.а. Т4-полинуклеотидкиназы (СибЭнзим, Россия) и 1 е.а. Т4-ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия) в 1 × лигазном буфере (30 mM Трис-НСl; pH = 7,8; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM дитиотрейтол; 1 mM аденозинтрифосфат). К полученным фрагментам присоединяли остатки дезоксиаденозина с использованием 1 е.а. фермента Klenow exo-

(Thermo Scientific, США), после чего NEB-адаптеры лигировали с помощью 1 е.а. Т4-ДНК-лигазы (СибЭнзим, Россия). Секвенирование полученных библиотек проводили на приборе MiniSeq (Illumina) с использованием реагентов MiniSeq High-Output reagent kit (300 циклов, 2×150 п.о.) (Illumina) в соответствии с инструкцией производителя.

### Анализ данных NGS

Последовательности адаптеров из демультимплексируемых прочтений удаляли программой Trimmomatic версии 0.32 [15] со следующими параметрами: «leading» — 20, «trailing» — 20, «minimum length» — 30. Оставшиеся прочтения собирали в контиги *de novo* программой SPAdes версии 3.9.0 с параметрами по умолчанию [16]. Для последующего анализа использовали файлы scaffolds.fasta. Гены и мутации, приводящие к устойчивости к антибиотикам, выявляли программой ResFinder [17], видовую принадлежность генома определяли программой KmerFinder [18]. Типирование на основе мультилокусных последовательностей (MLST — multi-locus sequencing typing) проводили программой MLST tool [19]. Помимо ResFinder, устойчивость к β-лактамам препаратами была проверена и по наличию мутаций в генах *gdpP* и *pbp4*, которые также могут быть связаны с резистентностью к цефалоспорином [20]. Филогенетический анализ по данным полногеномного секвенирования проводили с построением корового генома одновременно для геномов всех изолятов программами snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>) и FastTree 2 [21]. В качестве референса использовался геном *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325 (сборка генома NC\_007795.1). Общее число полиморфных позиций из корового генома, включенных в филогенетический анализ, составило 23315. Число мутаций между геномами изолятов оценивали по этому списку. Визуализацию полученного филогенетического дерева проводили программой MEGA версии 10.2.4 [22]. Для аннотации генов в контигах использовали программу RAST [23]. Определение spa-типов проводили с помощью программы spaTyper (<https://github.com/HCGB-IGTP/spaTyper>) по базе данных Ridom SpaServer (<http://spaserver.ridom.de/>). SSCmec-тип был определен программой SCCmecFinder-1.2 [24].

### Статистический анализ

Вычисление медианы и квартилей производили с помощью стандартного Python-пакета math. Уровень бутстрап-поддержки в филогенетическом анализе был получен из результатов построения филогенетического дерева в программе FastTree 2.

\* Российские рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам. Версия 2024-02. Смоленск: МАКМАХ, СГМУ; 2024. 192 с.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

**Характеристики выборки пациентов и изолятов**

Всего в исследовании приняли участие 13 пациентов с ППИ после эндопротезирования тазобедренного сустава, из которых у восьми пациентов были собраны по одному изоляту, у трех — по два и у двух — по три. Больше число изолятов от одного и того же пациента было связано с рецидивом развития инфекционного процесса и соответственно повторной госпитализацией. Медианное время от первичного эндопротезирования до госпитализации по причине развития ППИ составило 5 мес. (от 1 нед. до 10 лет) (табл. 1).

В 5 из 11 первичных случаев госпитализации, для которых есть данные о примененных антибиотиках, проводилась терапия одновременно двумя антибиотиками; одним и тремя антибиотиками — по три случая. В трех из четырех случаев с повторной инфекцией было назначено 3 и более антибиотиков. Наиболее часто использовался цефалоспориновый антибиотик I поколения — цефазолин (11 случаев госпитализации из 15, включая вторичные), а также гликопептид ванкомицин (6 случаев) (табл. 2).

В 5 из 11 первичных случаев госпитализации, для которых есть данные о примененных антибиотиках, проводилась терапия одновременно двумя антибиотиками; одним и тремя антибиотиками — по три случая. В трех из четырех случаев с повторной инфекцией было назначено 3 и более антибиотиков. Наиболее часто использовался цефалоспориновый антибиотик I поколения — цефазолин (11 случаев госпитализации из 15, включая вторичные), а также гликопептид ванкомицин (6 случаев) (табл. 2).

Таблица 1

**Характеристики пациентов, принявших участие в исследовании**

Характеристика		Значения
Возраст, Ме [Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ]		45 [39–58]
Мужской пол (n, %)		8 (62)
Время от операции до постановки диагноза	<30 дней	4
	91–365 дней	6
	>365 дней	2
Основная стратегия лечения	DAIR	2
	Двухэтапное лечение	6
	Операция по Girdlestone	7 с заменой (4 случая) или без замены (3) протеза

DAIR (debridement, antibiotics and implant retention) — хирургическая процедура, применяемая при ППИ и включающая санацию очага инфекции и антибиотикотерапию с сохранением протеза.

Таблица 2

**Характеристика изолятов *S. aureus* с указанием времени от первичного эндопротезирования до госпитализации и высевания соответствующего изолята и списком антибиотиков, полученных пациентов в стационаре, а также числом пар NGS-прочтений, которыми были секвенированы геномы**

Номер пациента	Номер изолята	Время от первичного эндопротезирования до госпитализации	Терапия антибиотиками	Число пар NGS-прочтений
1	153	2 года	ВКЦН; ЦФЦН	1658796
2	406	4 нед.	ВЦКН; ЦФТР	1355447
2	1063	4 года	МПМ; ЦФТР; ЦФЦН	3043924
5	379	10 мес.	н/д	2289340
5	212	1 год	ВКЦН; ЦФЗН	487278
5	264	17 мес.	ВКЦН; ЦФЗН; КТРЛ; РФМЦ	88448
6	359	4 мес.	н/д	385875
6	318	5 мес.	н/д	759876
6	412	7 мес.	н/д	1690858
7	310	1 год	АКЦН; ВКЦН; ЦФЗН	887505
8	419	4 мес.	АКЦН; ЦФЗН	5248835
9	3716	1 нед.	КТРЛ; ЦФЗН; ЭРПМ	2264877
10	326	4 нед.	ЦФЗН	1326171
10	348	1 мес.	ЦФЗН	648313
11	226	3 нед.	ВКЦН	564691
13	399	6 нед.	ВКЦН; ЦФЗН; ЦФЦН	1794654
13	3692	5 лет	КТРЛ; ЦФЗН; ЦФЦН	2233867
14	217	11 мес.	АКЦН; ЦФЗН	2128946
17	3825	5 мес.	ЦФЗН	322697
18	3808	10 лет	н/д	3155607

АКЦН — амикацин; ВКЦН — ванкомицин; КТРЛ — ко-тримоксазол; МПМ — меропенем; РФМЦ — рифампицин; ЦФЗН — цефазолин; ЦФТР — цефтриаксон; ЦФЦН — ципрофлоксацин; ЭРПМ — эртапенем; н/д — нет данных о том, какие антибиотики были использованы при терапии.

В первую очередь, исследование полученных изолятов *S. aureus* была направлено на выявление причины рецидива и определение источника повторной инфекции: могла происходить реактивация того же штамма бактерии после перенесенной антибиотикотерапии или совершалось заражение новым штаммом. Однако для того, чтобы была возможность идентификации родственных между собой изолятов, в исследование были включены и изоляты от пациентов с одной (первичной) госпитализацией по причине развития ППИ и успешно вылеченных в период одной госпитализации без развития рецидива ППИ при последующем наблюдении в течение двух лет и более.

**Антибиотикорезистентность изолятов**

Нуклеотидная последовательность всех геномов, кроме одного (изолят 264), была определена

с достаточной точностью: показатель N 50 был более 70 тыс. п.о. Поэтому все прочитанные геномы были включены в последующий анализ. Для генома изолята 264 ввиду недостаточного объема данных секвенирования были проведены все типы анализа, кроме аннотации генов *de novo*. Чтобы оценить распространение в исследуемой выборке генов резистентности к различным антибиотикам и оценить, насколько их наличие проявляется фенотипически, для всех геномов был проведен анализ программой ResFinder. Для большинства изолятов (17 из 20) была предположена резистентность к β-лактамам по наличию в геноме гена *blaZ* или *mecA* (табл. 3). Все *mec*-содержащие изоляты (226, 318, 359 и 412) содержали ген *mecA* и относились к типу SSCmec IVc (2B). В пяти случаях резистентность, предсказанная по наличию гена *blaZ*, совпала с фенотипической, а в одном случае

Таблица 3

**Список антимикробных препаратов, к которым исследуемые изоляты были устойчивы или чувствительны по результатам диско-диффузионного метода, карт для определения чувствительности Vitek AST-GP67 или анализа генома**

Изолят	βЛ	ЦФ	ВК	ГЦ	ЭЦ	ЦИП	ХФ	ТЦ	АЦН
153	R/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
212	R/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
217	R/?	S/S	S/S	R/R	S/S	S/S	S/?	R/R	R/S
226	R/?	R/R	S/S	R/R	R/R	R/R	R/?	R/R	R/S
264	R/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
310	R/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
318	R/?	R/R	S/S	S/S	S/S	R/R	R/?	S/S	S/S
326	R/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
348	R/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
359	R/?	R/R	S/S	S/S	S/S	R/R	R/?	S/S	S/S
379	R/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
399	S/?	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
406	R/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
412	R/?	R/R	S/S	R/R	S/S	R/R	R/?	R/R	R/S
419	R/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
1063	S/R	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/S
3692	R/R	S/S	S/S	S/S	S/?	S/S	S/?	S/S	S/S
3716	R/R	S/S							
3808	S/?								
3825	R/R	S/S							

Для каждого изолята и группы антибиотиков указаны сначала данные по результатам анализа генома, через черту — данные фенотипического тестирования (R — резистентный, S — чувствительный, ? — изолят не тестировался). βЛ — β-лактамы, ЦФ — цефокситин, ВК — ванкомицин, ГЦ — гентамицин, ЭЦ — эритромицин, ЦИП — ципрофлоксацин, ХФ — хлорамфеникол, ТЦ — тобрамицин, АЦН — амикацин. Цветом отмечены результаты, совпавшие по анализу геномов и фенотипическому тесту (зеленые и синие), не совпавшие (желтые и оранжевые), а также результаты, где устойчивость была показана только биоинформационными методами без проверки диско-диффузионным методом (фиолетовый). Резистентность к доксициклину, триметоприму, сульфометаксазолу и фосфомицину определялась только методами *in silico*: все изоляты были чувствительны к перечисленным антибиотикам.

изолят оказался чувствительным. Было выявлено и противоположное несовпадение: генов устойчивости к  $\beta$ -лактамам обнаружено в геноме не было, однако изолят был резистентным. Это может объясняться как ошибкой при фенотипическом тестировании, так и недостаточностью данных о различных механизмах резистентности.

Помимо анализа с помощью ResFinder, который предсказывает резистентность к  $\beta$ -лактамам по наличию в геноме гена *blaZ* или *mecA*, вручную был проведен поиск мутаций в генах *gdpP* и *pbp4*. Ранее для некоторых цефалоспоринов было показано появление резистентности, по механизму не зависящей от генов *blaZ* и *mecA* [25, 26]. В исследуемой выборке были найдены две мутации, ранее описанные в резистентных штаммах: с.-298С>Т (в промоторе) и р.Asp98Glu в гене *pbp4* изолята 217, который фенотипически был чувствителен к цефокситину. Скорее всего, это связано с тем, что по вышеперечисленным *mecA*-независимым механизмам в литературе в большинстве случаев пока только представлены данные о встречаемости этих мутаций в резистентных штаммах, однако не было проведено экспериментов, демонстрирующих, что именно эти мутации приводят к развитию резистентности. Исключение составляют, например, дупликация 36 п.о. и делеция 90 п.о. в промоторной области гена *pbp4*, для которых показана связь с высокой экспрессией гена, вследствие чего изменяется структура пептидогликана клеточной стенки, что и ведет к устойчивости [26, 27].

Другое несоответствие было выявлено для трех изолятов чувствительных, согласно диско-диффузионному методу, к амикацину (изоляты 217, 226 и 412), но у которых был обнаружен ген *aac(6')-aph(2'')*, что соответствует резистентности этих изолятов к гентамицину и тобрамицину. Такие несоответствия свидетельствуют о том, что оценка антибиотикорезистентности *S. aureus* по данным полногеномного секвенирования пока не может заменить фенотипическое тестирование изолятов ввиду неполноты понимания всех возможных механизмов резистентности к антибиотикам. Для всех изолятов, резистентных к ципрофлоксацину (226, 318, 359 и 412), были выявлены две мутации в генах *gyrA* (р.Ser84Leu) и *griA* (другое название гена — *parC*, р.Ser80Phe).

#### Филогенетический анализ геномов изолятов

Чтобы определить родство исследуемых изолятов, вызвавших ППИ, между собой, был проведен филогенетический анализ геномов с построением корового генома. Такой подход позволяет включать большую часть генома в анализ, однако исключает участки генома уникальные для отдельных изолятов, что упрощает алгоритм анализа. Также для каждого изолята был определен генотип MLST, со-

впадение по которому для разных изолятов свидетельствует о родстве изолятов. Кроме того, MLST может быть использован для сравнения со штаммами, описанными в литературе.

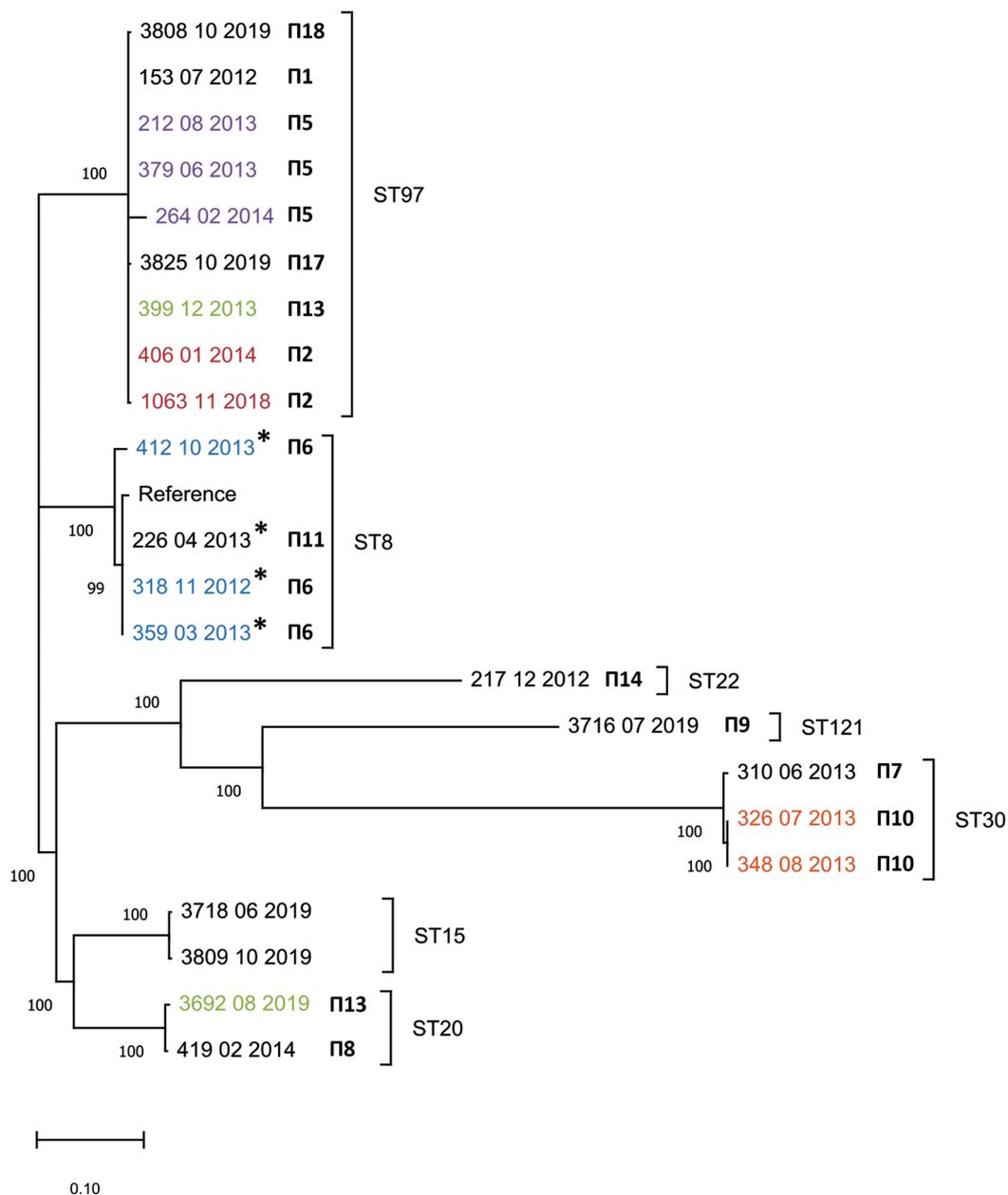
Согласно филогенетическому анализу, все изоляты разделились на шесть отдельных ветвей, что совпало с результатами MLST (рис. 1). Преобладающим MLST был ST97 (9 изолятов из 20), который относится к клональному комплексу 97 (CC97), часто выявляемому у сельскохозяйственных животных [28, 29, 30]. В отдельную ветвь были отнесены три изолята, относящиеся к MLST ST30, для которых ранее была показана связь с пищевыми инфекциями [31].

Наибольший интерес представляли изоляты от пациентов с повторной ППИ, обозначенных на рисунке 1 одинаковым цветом. У четырех из пяти пациентов повторная ППИ, по-видимому, была вызвана тем же штаммом (изоляты, выделенные фиолетовым, красным, синим и оранжевым цветами), что можно клинически трактовать как рецидив ППИ, а у одного (пациент № 13) ППИ вызвана штаммом от другого пациента, который был филогенетически родственным с этим штаммом и госпитализированным приблизительно в тот же период времени (зеленый цвет). На основании этого можно предположить, что при первичной госпитализации в декабре 2013 г. пациент № 13 был заражен от пациента № 8 штаммом, который циркулировал в тот период времени в стационаре — изолят 419 и который затем был выделен у пациента № 13 (изолят 3962) при госпитализации в феврале 2014 г. У пациента № 13 этот штамм (изолят 3692) вызвал рецидив ППИ через 5 лет, что привело к повторной госпитализации. При поступлении протез был удален (операция Girdlestoune) ввиду тяжелого рецидивирующего течения ППИ: к моменту повторной госпитализации пациент уже перенес 12 различных операций по различным медицинским показаниям, не связанных с эндопротезированием.

Среди оставшихся четырех пациентов (№ 5, 13, 6, 9) с повторной инфекцией, вызванной тем же штаммом, были два случая, когда эндопротез был удален из-за неэффективности лечения и рецидива ППИ (рис. 2). У пациента № 5 (изоляты 379, 212 и 264) можно предположить первичное заражение внутрибольничным штаммом во время госпитализации в августе 2012 г. изолятом 153, который был высеян у другого пациента (№ 1), госпитализированного из-за ППИ в июле 2012 г. (изолят 153). Через 2 мес. после купирования ППИ у пациента № 5 произошла реактивация того же штамма (изолят 212) с клиническим проявлением рецидива ППИ. После завершения курса терапии антибиотиками через полгода вновь развился рецидив ППИ (повторная реактивация — изолят

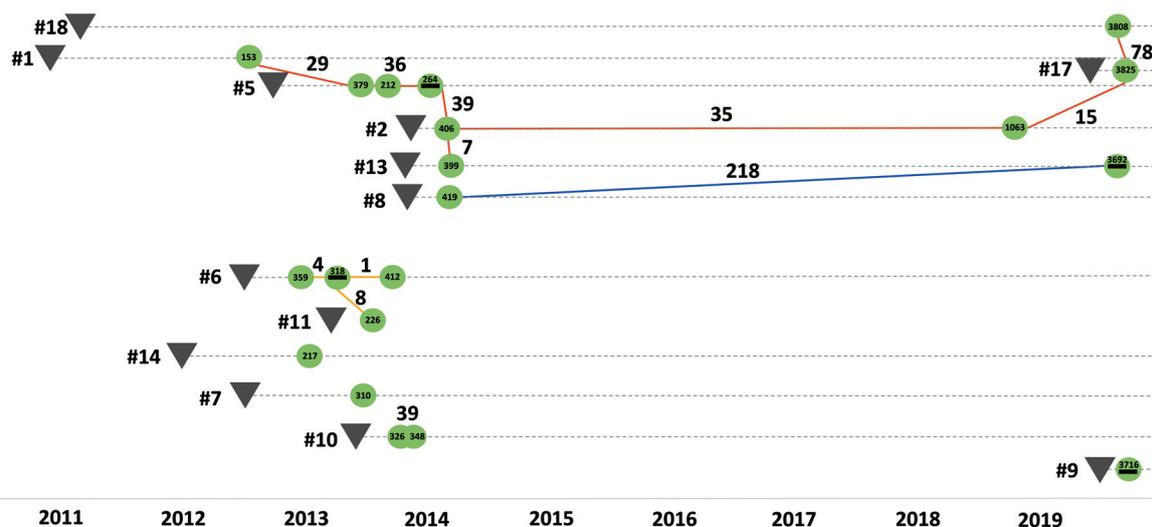
264). В итоге лечение ППИ было неэффективным, и эндопротез тазобедренного сустава был удален. При этом произошло инфицирование пациента

№ 2 (изолят 406) и пациента № 13 (изолят 399) от пациента № 5 с различием в числе мутаций 39 и 7 соответственно.



**Рис. 1.** Результаты филогенетического анализа геномов исследуемых изолятов с построением корового генома. Номера изолятов указаны с датой госпитализации (месяц и год) и номерами пациентов. Звездочкой отмечены мультирезистентные изоляты. Расстояния между узлами отражают генетические различия между образцами. Цветом обозначены пациенты с повторной инфекцией: для изолятов от одного пациента использован одинаковый цвет, число в скобках — MLST. Числа в узлах дерева указывают на уровень бутстрап-поддержки. Изоляты 3718 и 3809 использовались только в филогенетическом анализе, поскольку были получены от пациентов с инфекциями различными микроорганизмами

**Figure 1.** Results of phylogenetic analysis of genomes of the studied isolates with core genome construction. Isolate numbers are indicated with the date of hospital admission (month and year) and patient numbers. Multidrug-resistant isolates are marked with an asterisk. The distances between nodes reflect genetic differences between the samples. Colors represent patients with recurrent infections: isolates from the same patient are shown in the same color, with the number in parentheses indicating the MLST. Numbers at the nodes of the tree indicate bootstrap support levels. Isolates 3718 and 3809 were used only in the phylogenetic analysis, as they were obtained from patients with infections caused by different microorganisms



**Рис. 2.** Родство геномов исследуемых изолятов с указанием приблизительной даты первичного эндопротезирования соответствующего пациента (треугольник) и госпитализации по причине ППИ (зеленые круги). Пунктирная линия обозначает временную шкалу для каждого пациента. Оранжевые и синие линии — филогенетическое родство двух изолятов с числом отличий в геномах менее и более 100 соответственно. Над каждой такой линией указано число однонуклеотидных замен, инсерций и делеций, отличающих два генома. Минус в круге обозначает удаление эндопротеза, а число — номер изолята

**Figure 2.** Genetic relatedness of the studied isolates, indicating the approximate date of primary arthroplasty for the corresponding patient (triangle) and hospital admission due to PJI (green circles). The dashed line represents the timeline for each patient. Orange and blue lines indicate phylogenetic relatedness of two isolates with fewer than and more than 100 genomic differences, respectively. Above each such line, the number of single-nucleotide substitutions, insertions, and deletions distinguishing the two genomes is indicated. A minus sign in a circle denotes implant removal, and the number represents the isolate number

У пациента № 6 (изоляты 318, 359 и 412) также было проведено два курса антибиотикотерапии. Через 4 мес. после первого эпизода развития ППИ (изолят 359) произошла реактивация того же штамма (изолят 318), при этом геномы отличались по наличию четырех мутаций между геномами бактерий, что клинически проявлялось рецидивом ППИ. Эндопротез был сразу удален (операция Girdlestone) с проведением курса антибактериальной терапии. После хирургической паузы и реэндопротезирования с последующим курсом антибиотикотерапии вновь развился рецидив инфекционного процесса, вызванный тем же штаммом (изолят 412). Об идентичности штаммов говорит небольшое число мутаций. В связи с этим был проведен еще один курс антибиотикотерапии, после которого инфекционный процесс был купирован. При этом новая резистентность к аминогликозидам появилась только у изолята 412 (к гентамицину и тобрамицину благодаря гену *aac(6')-aph(2'')*). У данного пациента (№ 6) была обнаружена филогенетическая связь между изолятами *S. aureus* с другим пациентом (№ 11), от которого был получен изолят 226, содержащий такие же новые гены антибиотикорезистентности, как и изолят 412, что свидетельствует о том, что все эти

изоляты, скорее всего, имели внутрибольничный источник заражения.

У двух других пациентов (№ 2 и № 10) с повторной инфекцией выздоровление было зарегистрировано уже после второго курса антибиотикотерапии. Развившаяся первоначальная инфекция у пациента № 2 (изолят 406), по-видимому, тоже имела внутрибольничное происхождение из-за близкого филогенетического родства с изолятом 264 пациента № 5 (различия между геномами — всего 39 мутаций). После первого этапа терапии цефтриаксоном (1,0 г два раза в сутки) и ванкомицином (1,0 г два раза в день внутривенно) реактивация инфекции произошла только через 4 года и 10 мес. (изолят 1063). Но, учитывая срок развития после операции, допустимо данную клиническую ситуацию рассматривать как самостоятельный гематогенный транслокационный инфекционный процесс. Комбинированная терапия цефтриаксоном (1,0 г два раза в сутки), ванкомицином (1,0 г два раза в день внутривенно), меропенемом (1,0 г три раза в сутки), цефтаролина фосамилом (600 мг два раза в день) и ципрофлоксацином (400 мг два раза в сутки) в стационаре и бисептолом (960 мг два раза в день в течение 3 нед.) с ципрофлоксацином (500 мг два раза в день в течение 3 нед.)

на амбулаторном этапе привела к купированию ППИ с сохранением эндопротеза. При этом изолят 1063 по сравнению с изолятом 406 потерял ген *blaZ*, сохранив устойчивость к β-лактамам и став чувствительным к цефокситину. По-видимому, за такой долгий период произошел отбор на те бактерии, которые не содержат соответствующего гена. Для пациента № 10 в обоих случаях ППИ, вы-

званных одним и тем же штаммом, был применен цефазолин. После второго курса антибиотикотерапии ППИ была купирована, что, скорее всего, связано с повторной, более радикальной санацией с элементами некрэктомии и заменой парой трения в варианте Double DAIR. Связь между проведенными операциями, филогенетическим родством изолятов и исходом лечения представлена в таблице 4.

Таблица 4

**Связь между проведенными типами хирургического вмешательства и терапии, филогенетическим родством изолятов, а также исходами лечения пациентов**

Пациент	1-я операция / № изолята	Рец.	2-я операция / № изолята	Рец.	3-я операция / № изолята	Рец.	4-я операция	Исход
1	Установка спейсера / 153	Да	Операция Girdlestone / 153	Да				Хр. остеомиелит
2	Операция Girdlestone / 406	Да	Санация / 1063	Нет	Реэндопротезирование ТБС			Выздоровление
5	Установка спейсера / 379	Да	Повторная установка спейсера / 212	Да	Операция Girdlestone / 264	Да		Хр. остеомиелит
6	Установка спейсера / 359	Да	Операция Girdlestone / 318	Да	Санация / 412	Нет	Реэндопротезирование	Выздоровление
7	DAIR / 310	Да	Установка спейсера / 310	Да	Операция Girdlestone / 310	Нет		Условное выздоровление
8	Установка спейсера / 419	Да	Повторная установка спейсера / 419	Нет	Реэндопротезирование ТБС			Выздоровление
9	DAIR / 3716	Да	Установка спейсера / 3716	Да	Операция Girdlestone / 3716	Нет		Условное выздоровление
10	DAIR / 326	Да	DAIR / 348	Нет				Выздоровление
11	DAIR / 226	Нет						Выздоровление
13	Установка спейсера / 399	Да	Повторная установка спейсера / 399	Да	Операция Girdlestone / 3692			Условное выздоровление
14	Одноэтапная замена эндопротеза / 217	Нет						Выздоровление
17	Установка спейсера / 3825	Нет	Реэндопротезирование					Выздоровление
18	Одноэтапная замена эндопротеза / 3808	Нет						Выздоровление

Филогенетически родственные изоляты выделены одинаковым цветом. DAIR (Debridement, Antibiotics and Implant Retention — метод хирургического лечения ППИ с сохранением имплантата); операция Girdlestone — удаление эндопротеза без установки спейсера; санация — вариант вторичной хирургической обработки раны; хр. остеомиелит — хронический остеомиелит, ППИ инфекция не купирована, рецидивирующее течение; условное выздоровление — купирование ППИ без последующего реэндопротезирования ТБС, при этом конечность опорная с укорочением; выздоровление — после реэндопротезирования тазобедренного сустава в течение 12 мес. рецидива не наблюдается; рец. — рецидив.

### Состав генов в геномах изолятов с повторной инфекцией

В процессе антибиотикотерапии все изоляты от пациентов с повторной ППИ долгое время находились под интенсивным воздействием антибиотиков, в связи с чем были исследованы изменения в геномах изолятов от одного пациента. У двух пациентов со значительно отличающимся периодом ремиссии (4 года и 10 мес. у пациента № 10 и менее недели у пациента № 2) состав генов не изменился, несмотря на то, что 39 и 35 точечных мутаций, соответственно, отличали геномы изолятов между собой.

У пациента № 6 с выздоровлением по итогу лечения наблюдалась обратная зависимость: число точечных мутаций составило 4 и 1, а число новых генов между изолятами 359–318 и 318–412 составило 2 и 78 соответственно. Среди 78 генов были найдены гены, кодирующие ферменты синтеза полисахаридов капсулы, адгезины, фаговые белки, аминогликозид-N (6')-ацетилтрансферазу, дающую резистентность к аминогликозидам. При этом один из новых генов изолята 318 (ген, кодирующий белок фиксации (заякоривания) на поверхности клеточной стенки) был найден и в геноме изолята 412, что подтверждает их филогенетическое родство. С другой стороны, остается открытым для дальнейшего исследования вопрос об источнике новых генов в изоляте 412, поскольку большинство из них при анализе с помощью BLAST NCBI находятся в геномах других штаммов *S. aureus*, что подразумевает горизонтальный перенос этих генов из бактерий того же вида, которые должны были бы контактировать с изолятом, вызвавшим инфекцию.

Изолят 212 от пациента № 5 содержал 7 дополнительных генов, отсутствовавших в геноме изолята 379, среди которых были найдены гены, кодирующие маннитол-1-фосфат-5-дегидрогеназу, D-маннитол-пермеазу фосфотрансферазной системы, фибронектин-связывающий белок и никазу. У этого же пациента геном изолята 264 был секвенирован с глубиной, достаточной для филогенетического анализа, однако недостаточной для аннотации генов *de novo*. Появление новых генов, повышающих патогенность бактерий и определило, вероятно, рецидивирующее течение ППИ и ее исход в хронический остеомиелит.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Используя полногеномное секвенирование, нами были исследованы 13 случаев ППИ, вызванных различными штаммами *S. aureus*, из которых пять были с повторным развитием ППИ (рецидив). Именно случаи с рецидивом инфекции и являлись основным объектом исследования, поскольку их изучение улучшает наше понимание того, каким образом бактерии адаптируются к новым условиям после проведенного лечения [32]. Среди

всех антибиотиков наиболее часто (73% госпитализаций) применялся цефазолин в сочетании с другими антибиотиками. При этом в литературе известны случаи так называемого инокулюм-эффекта, когда минимальная ингибирующая концентрация повышается в 4 и более раз при высокой концентрации патогена и наличии в геноме гена β-лактамазы (*blaZ*), способной с низкой эффективностью гидролизовать молекулы цефазолина [33, 34]. Ген *blaZ* также был обнаружен у большинства изолятов — (85%), что связано с высоким распространением резистентности штаммов *S. aureus* к пенициллинам.

Нами был выявлен ряд несоответствий фенотипических проявлений и наличия или отсутствия генетических детерминант. Три изолята, резистентных к гентамицину и тобрамицину и содержащих ген *aac(6')-aph(2'')*, были чувствительны к амикацину, что достаточно часто описывается в литературе [35]. В связи с этим стоит с осторожностью относиться к определению антибиотикорезистентности исключительно по молекулярно-генетическому тестированию — результатам полногеномного секвенирования или ПЦР.

Среди собранных 20 изолятов *S. aureus* наиболее распространенные имели штаммы клонального комплекса 97 (СС97). Многие бактерии этого клонального комплекса часто обнаруживают у сельскохозяйственных животных [28, 29, 30], а для некоторых из них показана возможность перехода от животных к человеку [36, 37, 38]. Нельзя исключать возможность того, что широкое распространение в качестве внутригоспитальной инфекции эти штаммы могли получить тоже после перехода от животных к человеку с каких-либо фермерских хозяйств, тем более среди пациентов, оперированных по поводу коксартроза, половина представлена жителями сельской местности.

Нами была выявлена потенциальная цепочка заражения внутригоспитальным штаммом СС97 с 2011 по 2019 г. нескольких пациентов. Но ввиду того, что для подтверждения ее существования требуется значительно больше изолятов, дальнейшая работа была сфокусирована на повторных инфекциях одних и тех же пациентов. Используя данные полногеномного секвенирования, нам удалось показать, что в четырех из пяти случаев инфекция была вызвана филогенетически родственными изолятами, изменения в геноме которых подтверждает их родство. Появление новых генов антибиотикорезистентности к аминогликозидам наблюдалось только в одном случае из шести, что, по-видимому, связано с применением комбинаций из нескольких антимикробных препаратов, что снижало вероятность одновременного получения клеткой сразу нескольких генов.

Таким образом, используя полногеномное секвенирование, нам удалось показать филогенетическое родство изолятов, полученных на протяженном временном интервале от пациентов с ППИ, в том числе в случае повторной инфекции. Полученные результаты по накоплению изменений в геномах штаммов *S. aureus* как при впервые выявленных внутригоспитальных инфекциях, так и при рецидиве показывают, что подробное молекулярно-генетическое тестирование может помочь в выборе тактики терапии пациентов в зависимости от того, как в ответ на терапию антибиотиками изменяется геном бактерии.

Помимо изменения тактики антибактериальной терапии, результаты такого тестирования могут повлиять и на тактику хирургического лечения. В случае, если в среде присутствуют бактерии, которые вызывают ППИ и содержат в геноме гены антибиотикорезистентности, полученные в результате горизонтального переноса, тактика лечения ППИ должна быть радикальной. При формировании у бактерий антибиотикорезистентности, когда вынужденно увеличиваются дозы антибиотика для преодоления резистентности с неизбежной индукцией новых мутаций, продолжение двухэтапного курса лечения ППИ с повторными установками спейсера не только теряет смысл, но и создает угрозу формирования мультирезистентных бактерий. В этой ситуации целесообразно не сохранять инфицированный протез, а удалить его (операция Girdlestone), провести полноценную санацию гнойного очага и отказаться от установки спейсера. Отказ от повторной имплантации спейсера уменьшает курсовые дозы локальной и системной антибиотикотерапии, тем самым снижая мутационное давление на возбудители

ППИ. Удаление эндопротеза с последующей хирургической паузой (до 6–12 мес.) сокращает сроки терапии антибактериальными препаратами, снижает риски появления новых мутаций, а следовательно, и развития антибиотикорезистентности и повышает эффективность лечения. Последующее ревизионное эндопротезирование после хирургической паузы в этом случае представляется более обнадеживающим.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные полногеномного секвенирования позволяют выявлять филогенетически родственные изоляты, изменения в геноме которых подтверждают их родство. Выявление факта родства изолятов, выделенных при ранее леченной перипротезной инфекции и при ее рецидиве, указывает на факт реинфекции, вызванной прежними персистирующими изолятами, а не попавшими в рану извне во время реэндопротезирования, что позволяет исключить факт инфекции области хирургического вмешательства как эпидемиологического случая. И, наоборот, в случае родства изолятов у двух и более пациентов можно сделать вывод о непосредственном внутригоспитальном инфицировании. На фоне проводимой высокодозной антибактериальной терапии как в случае впервые выявленной внутригоспитальной перипротезной инфекции, так и при ее рецидиве, в геномах штаммов *S. aureus* накапливаются изменения, которые при подробном молекулярно-генетическом тестировании с выявлением мутаций в генах, а также вновь приобретенных генов вирулентности и резистентности могут помочь обосновать выбор радикальной тактики лечения перипротезной инфекции — удаление эндопротеза.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

### Заявленный вклад авторов

Кечин А.А. — анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи.

Боробова В.С. — анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи.

Шералиев Т.У. — сбор данных, редактирование текста рукописи.

Кретъен С.О. — сбор данных, редактирование текста рукописи.

Тромешлегер И.Н. — сбор данных, редактирование текста рукописи.

Павлов В.В. — концепция исследования, редактирование текста рукописи.

Филипенко М.Л. — дизайн исследования, редактирование текста рукописи.

Все авторы прочли и одобрили финальную версию рукописи статьи. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

## DISCLAIMERS

### Author contribution

Kechin A.A. — data analysis and interpretation, drafting and editing the manuscript.

Borobova V.S. — data analysis and interpretation, drafting the manuscript

Sheraliev T.U. — data acquisition, editing the manuscript.

Chretien S.O. — data acquisition, editing the manuscript.

Tromenshleger I.N. — data acquisition, editing the manuscript.

Pavlov V.V. — study concept, editing the manuscript.

Filipenko M.L. — study design, drafting the manuscript.

All authors have read and approved the final version of the manuscript of the article. All authors agree to bear responsibility for all aspects of the study to ensure proper consideration and resolution of all possible issues related to the correctness and reliability of any part of the work.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБУН «ИХБФМ» СО РАН № 125012300671-8.

**Возможный конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Этическая экспертиза.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, протокол № 011/19 от 20.09.2019 г.

**Информированное согласие на публикацию.** Авторы получили письменное согласие пациентов на участие в исследовании и публикацию результатов.

**Funding source.** This work was supported by the Russian state-funded project for ICBFM SB RAS (grant number 125012300671-8).

**Disclosure competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethics approval.** The study was approved by the local ethics committee of Tsivyanovsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, protocol No 011/19, 20.09.2019.

**Consent for publication.** The authors obtained written consent from patients to participate in the study and publish the results.

## ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Божкова С.А., Преображенский П.М., Кочиш А.А., Тихилов Р.М., Артюх В.А., Клиценко О.А. Перипротезная инфекция коленного и тазобедренного суставов — можно ли сравнивать результаты лечения? *Травматология и ортопедия России*. 2023;29(4):5-13. doi: 10.17816/2311-2905-15526. Bzhkova S.A., Preobrazhensky P.M., Kochish A.A., Tikhilov R.M., Artyukh V.A., Klitsenko O.A. Periprosthetic Knee and Hip Infection — Is It Possible to Compare Treatment Outcomes? *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2023;29(4):5-13. (In Russian). doi: 10.17816/2311-2905-15526.
2. Малюченко Л.И., Николаев Н.С., Яковлев В.В., Преображенская Е.В. Среднесрочные результаты лечения перипротезной инфекции с применением спейсеров с углеродным покрытием, импрегнированных серебром. *Травматология и ортопедия России*. 2023;29(4):14-23. doi: 10.17816/2311-2905-7997. Malychenko L.I., Nikolaev N.S., Yakovlev V.V., Preobrazhenskaya E.V. Treating Periprosthetic Joint Infection With Silver-Impregnated Carbon-Coated Spacers: Mid-Term Outcomes. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2023;29(4):14-23. (In Russian). doi: 10.17816/2311-2905-7997.
3. Касимова А.Р., Туфанова О.С., Гордина Е.М., Гвоздецкий А.Н., Радаева К.С., Рукина А.Н. и др. Двенадцатилетняя динамика спектра ведущих возбудителей ортопедической инфекции: ретроспективное исследование. *Травматология и ортопедия России*. 2024;30(1):66-75. doi: 10.17816/2311-2905-16720. Kasimova A.R., Tufanova O.S., Gordina E.M., Gvozdetsky A.N., Radaeva K.S., Rukina A.N. et al. Twelve-Year Dynamics of Leading Pathogens Spectrum Causing Orthopedic Infection: A Retrospective Study. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2024;30(1):66-75. (In Russian). doi: 10.17816/2311-2905-16720.
4. Auñón Á., Tovar-Bazaga M., Blanco-García A., García-Sañete J., Parrón R., Esteban J. Does a New Antibiotic Scheme Improve the Outcome of Staphylococcus aureus-Caused Acute Prosthetic Joint Infections (PJI) Treated with Debridement, Antibiotics and Implant Retention (DAIR)? *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(7):922. doi: 10.3390/antibiotics11070922.
5. Wildeman P., Tevell S., Eriksson C., Lagos A.C., Söderquist B., Stenmark B. Genomic characterization and outcome of prosthetic joint infections caused by Staphylococcus aureus. *Sci Rep*. 2020;10(1):5938. doi: 10.1038/s41598-020-62751-z.
6. Renz N., Trampuz A., Perka C., Rakow A. Outcome and Failure Analysis of 132 Episodes of Hematogenous Periprosthetic Joint Infections-A Cohort Study. *Open Forum Infect Dis*. 2022;9(4):ofac094. doi: 10.1093/ofid/ofac094.
7. Hartman C.W., Daubach E.C., Richard B.T., Lyden E.R., Haider H., Kildow B.J. et al. Predictors of Reinfection in Prosthetic Joint Infections Following Two-Stage Reimplantation. *J Arthroplasty*. 2022;37(7S):S674-S677. doi: 10.1016/j.arth.2022.03.017.
8. Bongers J., Jacobs A.M.E., Smulders K., van Hellemond G.G., Goosen J.H.M. Reinfection and re-revision rates of 113 two-stage revisions in infected TKA. *J Bone Jt Infect*. 2020;5(3):137-144. doi: 10.7150/jbji.43705.
9. Honkanen M., Jämsen E., Karpelin M., Huttunen R., Eskelinen A., Syrjänen J. Periprosthetic Joint Infections as a Consequence of Bacteremia. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(6):ofz218. doi: 10.1093/ofid/ofz218.
10. Chaplin A.V., Korzhanova M., Korostin D.O. Identification of bacterial antibiotic resistance genes in next-generation sequencing data (review of literature). *Klin Lab Diagn*. 2021;66(11):684-688. (In English). doi: 10.51620/0869-2084-2021-66-11-684-688.
11. Кубанов А.А., Рунина А.В., Честков А.В., Кудрявцева А.В., Пеков Ю.А., Корвиго И.О. и др. Полногеномное секвенирование российских штаммов Neisseria gonorrhoeae, отнесенных к генотипу ST 1407. *Acta Naturae*. 2018;10(3):68-76. doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-68-76. Kubanov A.A., Runina A.V., Chestkov A.V., Kudryavtseva A.V., Pekov Y.A., Korvigo I.O. et al. Whole-Genome Sequencing of Russian Neisseria Gonorrhoeae Isolates Related to ST 1407 Genogroup. *Acta Naturae*. 2018;10(3):68-76. (In Russian). doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-68-76.
12. Фёдоров Е.А., Кретъен С.О., Самохин А.Г., Тикунова Н.В., Корыткин А.А., Павлов В.В. Ближайшие результаты лечения стафилококковой перипротезной инфекции тазобедренного сустава с использованием комбинированной терапии антибиотиками и бактериофагами. *Acta Biomedica Scientifica*. 2021;6(4):50-63. doi: 10.29413/ABS.2021-6.4.5. Fedorov E.A., Kretien S.O., Samokhin A.G., Tikunova N.V., Korytkin A.A., Pavlov V.V. Short-term results of treatment of staphylococcal periprosthetic hip joint infection with combined antibiotics and bacteriophages treatment. *Acta Biomedica Scientifica*. 2021;6(4):50-63. (In Russian). doi: 10.29413/ABS.2021-6.4.5.

13. Nabal Díaz SG, Algara Robles O, García-Lechuz Moya JM. New definitions of susceptibility categories EUCAST 2019: clinic application. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35 Suppl 3(Suppl 3):84-88. doi: 10.37201/req/s03.18.2022.
14. Kechin A., Boldyreva D., Borobova V., Boyarskikh U., Scherbak S., Apalko S. et al. An inexpensive, simple and effective method of genome DNA fragmentation for NGS libraries. *J Biochem.* 2021;170(5):675-681. doi: 10.1093/jb/mvab089.
15. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
16. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., Lapidus A., Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020;70(1):e102. doi: 10.1002/cpbi.102.
17. Bortolaia V., Kaas R.S., Ruppe E., Roberts M.C., Schwarz S., Cattoir V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491-3500. doi: 10.1093/jac/dkaa345.
18. Clausen P.T.L.C., Aarestrup F.M., Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):307. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6.
19. Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S., Friis C., Hasman H., Marvig R.L. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11.
20. Гостев В.В., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В. Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамам антибиотикам. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2021;23(4):375-387. doi: 10.36488/cmasc.2021.4.375-387.
- Gostev V.V., Punchenko O.E., Sidorenko S.V. Current concepts of *Staphylococcus aureus* resistance to beta-lactam antibiotics. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2021;23(4):375-387. (In Russian). doi: 10.36488/cmasc.2021.4.375-387.
21. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010;5(3):e9490. doi: 10.1371/journal.pone.0009490.
22. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
23. Overbeek R., Olson R., Pusch G.D., Olsen G.J., Davis J.J., Disz T. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D206-214. doi: 10.1093/nar/gkt1226.
24. Ito T., Hiramatsu K., Oliveira D.C., De Lencastre H., Zhang K., Westh H. et al. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):4961-4967. doi: 10.1128/AAC.00579-09.
25. Argudín M.A., Dodémont M., Taguemont M., Roisin S., de Mendonça R., Deplano A. et al. In vitro activity of ceftaroline against clinical *Staphylococcus aureus* isolates collected during a national survey conducted in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(1):56-59. doi: 10.1093/jac/dkw380.
26. Hamilton S.M., Alexander J.A.N., Choo E.J., Basuino L., da Costa T.M., Severin A. et al. High-Level Resistance of *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -Lactam Antibiotics Mediated by Penicillin-Binding Protein 4 (PBP4). *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e02727-16. doi: 10.1128/AAC.02727-16.
27. Henze U.U., Roos M., Berger-Bächi B. Effects of penicillin-binding protein 4 overproduction in *Staphylococcus aureus*. *Microb Drug Resist.* 1996;2(2):193-199. doi: 10.1089/mdr.1996.2.193.
28. Gómez-Sanz E., Torres C., Lozano C., Fernández-Pérez R., Aspiroz C., Ruiz-Larrea F. et al. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(10):1269-1277. doi: 10.1089/fpd.2010.0610.
29. Feltrin F., Alba P., Kraushaar B., Ianzano A., Argudín M.A., Di Matteo P. et al. A Livestock-Associated, Multidrug-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 97 Lineage Spreading in Dairy Cattle and Pigs in Italy. *Appl Environ Microbiol.* 2015;82(3):816-821. doi: 10.1128/AEM.02854-15.
30. Hoekstra J., Zomer A.L., Rutten V.P.M.G., Benedictus L., Stegeman A., Spaninks M.P. et al. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. *Sci Rep.* 2020;10(1):18172. doi: 10.1038/s41598-020-75179-2.
31. Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н. и др. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации. *Вестник Российской академии наук.* 2017;72(5):346-354. doi: 10.15690/vramn889.
- Abaev I.V., Skryabin Yu.P., Kislichkina A.A., Korobova O.V., Mitsevich I.P., Mukhina T.N. et al. Genomic analysis of *Staphylococcus aureus* strains of clonal lineage 30 — causative agents of foodborne infection in the Russian Federation. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences.* 2017;72(5):346-354. (In Russian). doi: 10.15690/vramn889.
32. Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020;65(6):387-393. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-387-393.
- Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. General principles of antibiotic resistance evolution in bacteria (review of literature). *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2020;65(6):387-393. (In Russian). doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-387-393.
33. Ваганова А.Н., Борисенко С.В., Нестерова Е.В., Трофимова Н.Н., Литвиненко И.В., Петунова Я.Г. и др. Инокулюм-эффект к цефазолину среди чувствительных к метициллину изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с заболеваниями кожи. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2021;23(2):205-211. doi: 10.36488/cmasc.2021.2.205-211.
- Vaganova A.N., Borisenko S.V., Nesterova E.V., Trofimova N.N., Litvinenko I.V., Petunova Ya.G. et al. Inoculum effect to cefazolin among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from patients with skin diseases. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2021;23(2):205-211. (In Russian). doi: 10.36488/cmasc.2021.2.205-211.

34. Mossman A.K., Svishchuk J., Waddell B.J.M., Izydorczyk C.S., Buckley P.T., Hilliard J.J. et al. Staphylococcus aureus in Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis: Prevalence and Genomic Basis of High Inoculum  $\beta$ -Lactam Resistance. *Ann Am Thorac Soc.* 2022;19(8):1285-1293. doi: 10.1513/AnnalsATS.202108-965OC.
35. Fathi J., Hashemizadeh Z., Dehkordi R.S., Bazargani A., Javadi K., Hosseini-Nave H. et al. Evaluation of aminoglycoside modifying enzymes, SCCmec, coagulase gene and PCR-RFLP coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolates from hospitals in Shiraz, southwest of Iran. *Heliyon.* 2022;8(8):e10230. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10230.
36. Spoor L.E., McAdam P.R., Weinert L.A., Rambaut A., Hasman H., Aarestrup F.M. et al. Livestock origin for a human pandemic clone of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *mBio.* 2013;4(4):e00356-13. doi: 10.1128/mBio.00356-13.
37. Boswihi S.S., Udo E.E., Mathew B., Noronha B., Verghese T., Tappa S.B. Livestock-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Patients Admitted to Kuwait Hospitals in 2016-2017. *Front Microbiol.* 2020;10:2912. doi: 10.3389/fmicb.2019.02912.
38. Lozano C., Gómez-Sanz E., Benito D., Aspiroz C., Zarazaga M., Torres C. Staphylococcus aureus nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(6):500-505. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.02.004.

#### Сведения об авторах

✉ Кечин Андрей Андреевич — канд. биол. наук  
 Адрес: Россия, 630090, г. Новосибирск,  
 пр. Академика Лаврентьева, д. 8  
<https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>  
 e-mail: aa\_kechin@niboch.nsc.ru

Боробова Виктория Сергеевна  
<https://orcid.org/0000-0002-4443-3997>  
 e-mail: v.borobova@mail.ru

Шералиев Таалайбек Усеналиевич  
<https://orcid.org/0000-0002-7261-2730>  
 e-mail: sheraliev.taalai@mail.ru

Кретъен Светлана Олеговна  
<https://orcid.org/0000-0003-0074-8062>  
 e-mail: ssonovo64@inbox.ru

Троменишлегер Ирина Николаевна  
<https://orcid.org/0009-0006-9543-3547>  
 e-mail: irinatrom@mail.ru

Павлов Виталий Викторович — д-р мед. наук, доцент  
<https://orcid.org/0000-0002-8997-7330>  
 e-mail: pavlovdoc@mail.ru

Филипенко Максим Леонидович — д-р мед. наук  
<https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>  
 e-mail: max@niboch.nsc.ru

#### Authors' information

✉ Andrey A. Kechin — Cand. Sci. (Biol.)  
 Address: 8. Akademika Lavrentieva ave., Novosibirsk,  
 630090, Russia  
<https://orcid.org/0000-0002-4822-0251>  
 e-mail: aa\_kechin@niboch.nsc.ru

Victoria S. Borobova  
<https://orcid.org/0000-0002-4443-3997>  
 e-mail: v.borobova@mail.ru

Taalaiibek U. Sheraliev  
<https://orcid.org/0000-0002-7261-2730>  
 e-mail: sheraliev.taalai@mail.ru

Svetlana O. Chretien  
<https://orcid.org/0000-0003-0074-8062>  
 e-mail: ssonovo64@inbox.ru

Irina N. Tromenshleger  
<https://orcid.org/0009-0006-9543-3547>  
 e-mail: irinatrom@mail.ru

Vitaliy V. Pavlov — Dr. Sci. (Med.), Associate Professor  
<https://orcid.org/0000-0002-8997-7330>  
 e-mail: pavlovdoc@mail.ru

Maksim L. Filipenko — Dr. Sci. (Med.)  
<https://orcid.org/0000-0002-8950-5368>  
 e-mail: max@niboch.nsc.ru