

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ШТАММОВ *S. EPIDERMIDIS* И ИХ РОЛЬ В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ ИМПЛАНТАТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ ПОСЛЕ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ

С.А. Божкова, Т.Я. Богданова, М.В. Краснова, Л.О. Анисимова, Г.И. Нетылько, А.Н. Рукина, Лю Бо

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России,  
директор – д.м.н. профессор Р.М. Тихилов  
Санкт-Петербург

*S. epidermidis* является самой распространенной причиной имплантат-ассоциированных инфекций и занимает второе место после золотистого стафилококка в структуре ведущих возбудителей инфекционных осложнений после ортопедических операций. Инфекции, обусловленные *S. epidermidis*, редко перерастают в опасные для жизни, тем не менее, их широкая распространенность и трудности в лечении представляют собой серьезную финансовую нагрузку для системы здравоохранения. Настоящее исследование основано на изучении фенотипических особенностей, таких как способность к формированию микробных биопленок и антибиотикорезистентность штаммов *S. epidermidis*, выделенных от пациентов с глубокой инфекцией области хирургического вмешательства (ГИОХВ) после установки ортопедических имплантатов в зависимости от наличия у них остеомиелита; а также на изучении динамики клинико-морфологических изменений при развитии имплантат-ассоциированной инфекции, обусловленной *S. epidermidis*, в разработанной *in vivo* экспериментальной модели.

Установлено, что полирезистентность характерна для более чем 23% MSSE изолятов и 97,3% – MRSE. Наибольшая активность в отношении данных возбудителей установлена у ванкомицина, линезолида и фосфомицина. Около 40% тестируемых изолятов обладают выраженной способностью к формированию биопленок. Имеются также штаммоспецифические факторы вирулентности *S. epidermidis*: выраженной способностью к формированию биопленок обладали 43,2% штаммов MRSE и только 21,4% вошедших в исследование штаммов MSSE. На разработанной экспериментальной модели было показано, что интраоперационное инфицирование имплантата полирезистентным клиническим штаммом MRSE привело к развитию остеомиелита у крыс в течение 4 недель после операции, несмотря на проведение санации гнойного очага и установку антимикробного цементного спейсера в область дефекта костной ткани. Таким образом, *S. epidermidis* представляет собой клинически значимый этиологический фактор с высоким потенциалом и значительной вероятностью возникновения инфекций после крупных ортопедических операций.

**Ключевые слова:** *S. epidermidis*, имплантат-ассоциированная инфекция, глубокая инфекция области хирургического вмешательства, остеомиелит, ортопедическая хирургия, биопленки.

## EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDY OF PHENOTYPIC FEATURES OF *S. EPIDERMIDIS* STRAINS AND THEIR ROLE IN THE EMERGENCE AND DEVELOPMENT OF IMPLANT-ASSOCIATED INFECTION AFTER ORTHOPAEDIC SURGERY

S.A. Bozhkova, T.Ya. Bogdanova, M.V. Krasnova, L.O. Anisimova, G.I. Netyl'ko, A.N. Rukina, Lyu Bo

Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, director – R.M. Tikhilov, MD Professor  
St. Petersburg

*S. epidermidis* is one of the most common cause of implant-associated infections. Infections due to *S. epidermidis* rarely develops into life-threatening, however, its prevalence and the difficulties in treating constitute a serious financial burden to the health care system. This study is based on the investigation of phenotypic features (ability to biofilm formation and resistance to antibiotics) of *S. epidermidis* strains isolated from patients with deep surgical site infection after implantation of orthopaedic devices, and on the investigation of the dynamics of clinical and morphological changes during the development of implant-associated infection due to *S. epidermidis* based on *in vivo* experimental models.

Multidrug-resistance was found in 23% MSSE isolates and 97,3% – MRSE. Vancomycin, linezolid and fosfomycin were the most active in relation to these pathogens. About 40% of the tested isolates were strong biofilm-producing strains. 43,2% of MRSE strains and only 21,4% of MSSE isolates demonstrated strong biofilm production. The proposed experimental model shows that intra-operative infection of implant by multidrug-resistant clinical MRSE strain led to the development of osteomyelitis in rats for 4 weeks after surgery, in spite of the revision operation and installation of antimicrobial cement spacer in the area of bone defect. Thus, *S. epidermidis* is a clinically significant aetiological factor with high risk of development of infections after major orthopaedic surgery.

**Key words:** *S. epidermidis*, implant-associated infections, deep surgical site infection, osteomyelitis, orthopaedic surgery, biofilms.

В настоящее время *S. epidermidis* рассматривают в качестве важного оппортунистического патогена, который нередко оказывается возбудителем внутрибольничных инфекций, приближаясь по уровню частоты выделения к *S. aureus*, наиболее вирулентному виду стафилококков. Кроме того, *S. epidermidis* является самой распространенной причиной имплантат-ассоциированных инфекций (ИАИ) в целом [13], занимая второе место после золотистого стафилококка в структуре ведущих возбудителей инфекционных осложнений после ортопедических операций [2, 3, 16]. Это, вероятно, связано с постоянной и повсеместной колонизацией кожных покровов человека штаммами *S. epidermidis*, благодаря чему всегда существует высокая вероятность микробного загрязнения конструкции во время имплантации, так как в интраоперационном периоде значительно снижается порог, при котором контаминирующие грамположительные бактерии, особенно эпидермальный стафилококк, вызывают инфекцию и формируют биопленку с фенотипической устойчивостью к почти всем антибиотикам [16].

Проблемы антибиотикотерапии таких инфекций возникают из-за наличия у *S. epidermidis* специфических генов антибиотикорезистентности, а также генов, детерминирующих адгезию к имплантатам и последующее формирование многоуровневых многоклеточных биопленок, обладающих внутренней резистентностью не только к антибиотикам, но и к факторам иммунной защиты макроорганизма, что способствует хронизации инфекционного процесса [1, 13]. Помимо биопленко-ассоциированных молекул, у штаммов *S. epidermidis* обнаружены различные поверхностные белки с адгезивными свойствами, часто обозначаемые как MSCRAMM – компоненты микробной поверхности, распознающие молекулы адгезии матрикса и осуществляющие непосредственное прикрепление к клеткам макроорганизма [7].

Инфекции, обусловленные *S. epidermidis*, редко перерастают в опасные для жизни, тем не менее их широкая распространенность и трудности в лечении представляют собой серьезную нагрузку для системы здравоохранения. Таким образом, необходимо детальное изучение имплантат-ассоциированных инфекций, вызванных *S. epidermidis*, для дальнейшей разработки наиболее эффективных подходов к профилактике и лечению этих тяжелых осложнений ортопедических операций.

**Цель:** оценить фенотипические свойства (способность к формированию микробных биопленок, антибиотикорезистентность) штаммов *S. epidermidis*, выделенных от пациентов с глубокой инфекцией области хирургического вмешательства (ГИОХВ) после установки ортопедических

имплантатов, и изучить динамику клинико-морфологических изменений при развитии ИАИ, обусловленной *S. epidermidis*, в разработанной *in vivo* экспериментальной модели.

### Материал и методы

В исследование включены 87 штаммов *S. epidermidis*, выделенных из тканевых биоптатов, аспиратов и с удаленных ортопедических конструкций от пациентов, лечившихся в отделении гнойной хирургии РНИИТО им. Р. Р. Вредена в 2012 г. по поводу ИАИ после ортопедических операций (табл.1).

Таблица 1

**Распределение пациентов по виду хирургического вмешательства, предшествующего развитию ИАИ, обусловленной *S. epidermidis***

Вид хирургического вмешательства	Количество пациентов
Эндопротезирование тазобедренного сустава	44
Эндопротезирование коленного сустава	31
Остеосинтез костей голени	5
Спондилосинтез	4
Эндопротезирование плечевого сустава	2
Эндопротезирование локтевого сустава	1
Итого	87

**Идентификация возбудителей и определение антимикробной чувствительности.** Для бактериологического исследования образцов патологического материала использовали метод посева на питательные среды. Исследование аспиратов осуществляли с использованием анализатора Bact/ALERT (bioMerieux), аналогично исследованию крови на гемокультуру. Тканевые биоптаты предварительно гомогенизировали (TissueRuptor, QIAGEN) и после 5 суток преинкубации в среде накопления высевали на плотные питательные среды. Удаленные ортопедические конструкции, погруженные в стерильный 0,9% раствор NaCl, в течение 5 мин обрабатывали ультразвуком для деструкции биопленки, и полученную взвесь сессильных микробных клеток высевали на питательные среды [15].

Видовую идентификацию полученных штаммов выполняли ручным методом и с использованием тест-систем MIRRO-LA-TEST (Erba Lachema, Чехия) для автоматической идентификации. Выявление метициллинорезистентности осуществляли диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием агара Мюллера – Хинтона и дисков с цефокситином (FOX 30) (Oxoid, UK), оценивая зону подавления роста стафилококков: резистентными

считали штаммы с диаметром зоны подавления роста для *S. aureus* <22 мм, для *S. epidermidis* <25 мм (EUCAST, версия 1.3) [11]. Также определяли чувствительность изолятов к антибиотикам: бензилпенициллин, гентамицин, клиндамицин, ко-тримоксазол, линезолид, моксифлоксацин, рифапицин, тетрациклин, фосфомицин, ципрофлоксацин, эритромицин.

**Выявление способности к формированию биопленок у клинических штаммов *S. epidermidis*.** Пленкообразующие свойства штаммов *S. epidermidis* изучали по методу Christensen с соавторами с минимальными изменениями в собственной модификации [8]. Суточную бульонную культуру *Staphylococcus spp.* (18 ч, 37°C) стерильным питательным бульоном приводили к стандартной мутности 0,5 McFarland, разбавляли в 100 раз и полученную микробную взвесь (106 КОЕ/мл) по 150 мкл вносили в лунки стерильных 96-луночных микропланшет, соблюдая четырехкратные повторности. В каждую серию опытов для оценки воспроизводимости результатов включали референтные штаммы *S. aureus* ATCC 6538 и *S. aureus* ATCC 25923. Отрицательным контролем служили лунки со стерильным питательным бульоном. Закрытые крышками планшеты инкубировали во влажной камере 48 ч при 37°C, после чего удаляли инкубационную среду с микробным планктоном и вносили в лунки по 170 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового на 40 мин. Затем планшеты трехкратно отмывали водой и проводили экстракцию красителя этиловым спиртом в течение 45 мин с последующим измерением оптической плотности (ОП) полученных экстрактов кристаллического фиолетового при длине волны 540 нм (iEMS- фотометр, Thermo Labsystems). Средние значения по результатам четырехкратных измерений вносили в базу данных эксперимента. Для референтных штаммов *S. aureus* ATCC 6538 и *S. aureus* ATCC 25923 средние значения ОП и среднее квадратичное отклонение между сериями измерений степени БПО составили  $0,596 \pm 0,127$  и  $0,052 \pm 0,018$ , соответственно. По результатам измерения оптической плотности штаммы, в зависимости от их способности к биопленкообразованию, были распределены на две группы: БПО-0 – слабые биопленкообразователи (ОП < 0,2) и БПО-1 – сильные биопленкообразователи (ОП ≥ 0,2) [10].

**Экспериментальная модель развития ГИОХВ, обусловленной установкой имплантата, инфицированного клиническим штаммом *S. epidermidis*.** Штамм *S. epidermidis* (лабораторный номер 1341/12) выделен с ортопедической конструкции, удаленной в ходе санирующей операции от пациента с пара-

эндопротезной инфекцией. Данный штамм *S. epidermidis*, являясь метициллинорезистентным (MRSE), характеризовался множественной антибиотикорезистентностью. Результаты исследования пленкообразующих свойств штамма позволили отнести его к сильным биопленкообразователям (ОП=0,566) и включить его в разработку модели ИАИ у крыс.

Для инокуляции имплантируемых фрагментов спиц готовили бактериальную суспензию с использованием суточной бульонной культуры *S. epidermidis* 1341/12: после приведения ОП к 0,5 McF, далее стерильно разбавляли в 100 раз. Полученную суспензию  $10^6$  КОЕ/мл использовали в эксперименте. Фрагменты спиц Киршнера погружали в бактериальную суспензию, вынимали, давали стечь излишкам жидкости и высушивали на стерильной фильтровальной бумаге.

Опыты были выполнены на 26 крысах (самцах) породы Wistar массой 200–250 г. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам ФГБУ «РНИИТО им. Вредена» и рекомендациям Национального Совета по исследованиям и национальным законам. Моделирование ИАИ осуществляли посредством двухэтапного оперативного вмешательства. Каждый этап проводили под внутривенным наркозом (кетамин, реланиум) в асептических условиях.

После обработки операционного поля у наркотизированных животных фиксировали левую заднюю конечность. Выполняли послойный разрез в области надмышечка бедренной кости. На первом этапе через межмышечковое углубление бедренной кости спицей Киршнера диаметром 1,2 мм перфорировали костномозговой канал и расширяли его путем введения спицы большего диаметра (от 1,4 до 2,0 мм). Затем животным опытной группы (n=13) в костномозговой канал вносили 0,5 мл микробной взвеси суточной культуры *S. epidermidis*  $10^6$  КОЕ/мл, устанавливали инфицированную спицу Киршнера (длиной 3 см), выступающий край которой с целью фиксации загибали к мышечку (рис. 1). Далее обрабатывали послеоперационную рану антисептиком и накладывали один адаптационный шов (Монамит 2-0). Повязку не накладывали. Животным контрольной группы (n=13) имплантировали стерильную спицу в костномозговой канал бедренной кости аналогичным образом, но не вводили микробную взвесь.

Второй этап оперативного вмешательства выполняли на 14-е сутки после первого. Наркотизированным животным обеих групп в асептических условиях производили разрез длиной 0,7–1,0 см в области мышечка большеберцовой кости; остро и тупо выделяли металлоконструкции (направляли для микробиологического исследова-

ния). Животным опытной группы дополнительно выполняли санацию гнойного очага. После промывания канала бедренной кости 0,5% раствором хлоргексидина образовавшийся костный дефект в проксимальном отделе кости замещали блоком-видным спейсером, изготовленным из костного цемента с гентамицином (СМW1, DePuy), размером 0,2 × 1,2 см (рис. 2). Далее обрабатывали послеоперационную рану антисептиком и накладывали два адаптационных шва (Монамит 2-0).

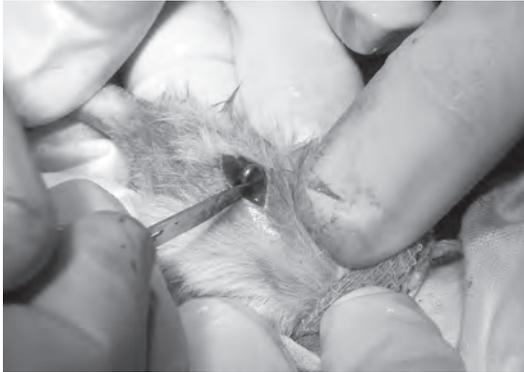


Рис. 1. Установка имплантата в костномозговой канал бедренной кости



Рис. 2. Установка цементного спейсера после удаления спицы Киршнера из костномозгового канала бедренной кости

В ходе эксперимента контролировали общее состояние и поведенческие реакции животных, потребление воды и корма. Оценивали клинические симптомы воспаления операционной раны и оперированной конечности. На 7, 14 и 28-е сутки выполняли динамическую оценку массы тела, окружности оперированного бедра, ректальной температуры животных, клинический анализ крови, полученной из полости сердца, проводили бактериологические и морфологические исследования тканевых биоптатов (кожи, мышц, кости и костного мозга); бактериологическое исследование удаленных имплантатов (спиц, спейсеров).

Исследование клеточного состава крови выполняли на автоматическом анализаторе

«Beckman Coulter LH-750» (США). Для гистологического исследования отделялся костно-мякотканый блок из средней трети бедра задней левой конечности крысы. Патоморфологический анализ гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, проводился на микроскопе «Axiostar plus» (Carl Zeiss, Германия). Для фотографирования микропрепаратов использовали микрофотонасадку МФНЭ-1 и цифровую видеокамеру «Baumer optronic» (Carl Zeiss, Германия) с системой ввода изображения «Видеотест» (Россия).

Эпидемиологический анализ данных, полученных в результате исследования, выполняли с применением программы «Система микробиологического мониторинга «Микроб-2»» (© 1999 – 2013 МедПроект-3); статистическую обработку – с помощью MS Office Excel, 2007 (Microsoft, США), для статистического анализа полученных данных был использован Z-критерий стандартного нормального распределения для оценки разности между долями [4].

## Результаты и обсуждение

**Оценка фенотипических свойств клинических штаммов *S. epidermidis*.** В 85% случаев штаммы *S. epidermidis*, выделенные от пациентов с ИАИ, были резистентны к метицилину (MRSE).

Ранее нами было показано, что в этиологической структуре ортопедической инфекции удельный вес *S. epidermidis* достигает 16,8% [2], а в процентном соотношении штаммы MRSE более чем в два раза превышают MRSA (56,6% vs. 23,9%,  $p < 0,05$ ) и характеризуются высокой ассоциированной устойчивостью к антибиотикам различных групп [3]. Установленные тенденции подтвердились и в настоящем исследовании. Данные таблицы 2 показывают, что штаммы MSSE, составляющие до 15% всех исследуемых изолятов по сравнению с MRSE, демонстрируют низкую резистентность (0–23%) к тестируемым антибиотикам, исключая бензилпенициллин. Однако в спектр устойчивости MSSE штаммов попадают рифампицин (15,4%), фосфомицин (7,7%) и ко-тримоксазол (23,1%). Установлено, что полирезистентность присуща чуть более 23% MSSE-изолятов. Метицилинорезистентные варианты *S. epidermidis* к большинству приведенных в перечне антибиотиков устойчивы в высокой степени (24,4–87,8%), в том числе, к рифампицину (26,8%) и ко-тримоксазолу (53,7%). Ряд авторов свидетельствуют о появлении рифампицин-устойчивых штаммов MRSA и MRSE [12, 14]. Как отмечают в своей публикации С.В. Сидоренко с соавторами, невысокий уровень устойчивости к рифампицину (14% резистентных штаммов) связан с его ограниченным применением, так как известно, что устой-

чивость к антибиотику формируется достаточно быстро даже в процессе лечения конкретных пациентов [5]. Вследствие этого препарат применяется для лечения инфекций, обусловленных метициллинорезистентными стафилококками, только в комбинации с другими антибиотиками, чаще всего с фторхинолонами. Наконец следует отметить, что чувствительными к бензилпенициллину остаются не более 6% штаммов *S. epidermidis*. В исследованной выборке резистентность к метициллину предопределила полирезистентность у 97,3% штаммов стафилококков.

Таблица 2

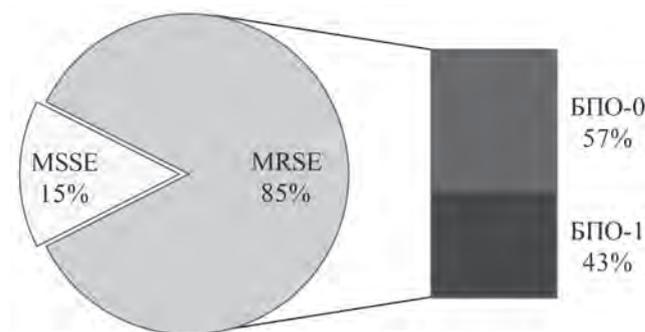
**Антибиотикорезистентность штаммов, включенных в исследование**

Антибиотик	Количество резистентных штаммов <i>S. epidermidis</i> , % (n)	
	MRSE (n=74)	MSSE (n=13)
Бензилпенициллин	100 (74)	38,5 (5)
Гентамицин	87,8 (65)	15,4 (2)
Эритромицин	75,6 (56)	23,1 (3)
Ципрофлоксацин	68,3 (51)	7,7 (1)
Тетрациклин	56,1 (42)	23,1 (3)
Ко-тримоксазол	53,7 (40)	23,1 (3)
Клиндамицин	34,1 (25)	7,7 (1)
Рифампицин	26,8 (20)	15,4 (2)
Моксифлоксацин	24,4 (18)	7,7 (1)
Фосфомицин	0	7,7 (1)
Ванкомицин	0	0
Линезолид	0	0

Учитывая небольшой удельный вес штаммов MSSE, к сожалению, не приходится возлагать надежды на эффективность эмпирической терапии антистафилококковыми препаратами I ряда, такими как бета-лактамы антибиотики, а следует назначать препараты, сохраняющие высокую активность в отношении MRSE – ванкомицин, линезолид или фосфомицин (см. табл. 2). Однако стоит отметить, что в данном случае речь идет о чувствительности планктонных форм бактериальных клеток. Как известно, sessильные (в составе биопленок) формы стафилококков в десятки и сотни раз устойчивее к антибиотикам [6]. Несомненно, на практике чувствительность возбудителя зависит во многом и от его пленкообразующей способности. Кроме того, вполне возможно, что химический состав биопленки непостоянен и может отличаться у разных штаммов [9], что также может оказывать влияние на эффективность антибиотикотерапии.

Установлено, что выраженной способностью (БПО-1) к формированию биопленок обладали 40,2% всех тестируемых штаммов. Дальнейший

анализ показал, что доля сильных биопленкообразователей составила 43,2% для MRSE изолятов и в два раза меньше (21,4%) – для MSSE (рис. 3). По-видимому, именно метициллинорезистентные стафилококки с выраженной способностью к формированию биопленок представляют собой часть возбудителей, наиболее трудно поддающихся эрадикации и, вероятно, являются причиной рецидивирующего течения инфекции, что требует дальнейшего изучения.



**Рис. 3.** Сравнительное распределение клинических изолятов *S. epidermidis* по чувствительности к метициллину и по способности к формированию биопленок у MRSE: БПО-0-штаммы – слабые биопленкообразователи; БПО-1-штаммы – сильные биопленкообразователи

Для изучения динамики клинико-морфологических изменений при развитии ГИОХВ, обусловленной эпидермальным стафилококком после установки ортопедического имплантата, на примере клинического штамма *S. epidermidis* 1341/12 была разработана экспериментальная модель *in vivo*, позволяющая в дальнейшем исследовать различные пути профилактики и лечения данного осложнения.

Оценка клинико-морфологических изменений у крыс после установки имплантата, инфицированного клиническим штаммом *S. epidermidis*. Через сутки после установки металлоконструкции у всех оперированных животных отмечали беспокойство, уменьшение потребления воды и корма, гипертермию в области проведения хирургического вмешательства и отек тканей в области бедра и коленного сустава. К 7-м суткам показатели массы тела животных опытной группы снизились в среднем на 18%, в то время как в контрольной группе – на 12% ( $p < 0,05$ ). Потеря массы тела от исходной у опытных животных к 28-му дню составила 30,6%, в то время как в контрольной группе дефицит не превышал 10%. В соответствии с этим у животных опытной группы в течение всего периода мониторинга значительно повышалась

ректальная температура и увеличивались показатели измерения объема оперированного бедра (табл. 3). Лабораторно в контрольной группе на 7-е сутки после первого этапа отмечали умеренный нейтрофильный лейкоцитоз (табл. 4). В опытной группе выраженный нейтрофильный лейкоцитоз наблюдался весь период исследования, достигая максимума ко 2-му этапу вмешательства: содержание лейкоцитов на 14-е сутки в 2,2 раза превышало исходный уровень ( $p < 0,05$ ).

У животных опытной группы макроскопически наблюдаемая динамика изменений со стороны послеоперационной раны свидетельствовала о развитии выраженного инфекционно-воспалительного процесса уже в раннем послеоперационном периоде: на 7-е сутки в области хирургического вмешательства обнаружены участки деструкции кожи и признаки нагноения в мышечном слое, к 14-м суткам отек нарастал, в области установки спиц прогрессировали явления гнойного воспаления и обнаруживались признаки формирования свищей. У двух животных на оперированной конечности определялись участки гнойного размягчения с флуктуацией, а удаленные металлоконструкции покрыты серозно-гнойным слизистым налетом. На 28-е сутки от начала опыта в области оперированного сустава и прилежащих мышц обнаружены многочисленные полости, заполненные сформированными плотными гнойными массами, а также деструкция костной ткани, формирующей костномозговой канал, то есть признаки, свидетельствующие о развитии остеомиелита бедер-

ной кости в области установки имплантата. У животных контрольной группы отек оперированной конечности без признаков абсцедирования в области установки имплантата сохранялся не более 7 суток, а к 14-м суткам стихали клинические симптомы воспаления, удаленные спицы макроскопически выглядели без налета и гноя. На 28-е сутки в контрольной группе животных воспалительные изменения оперированной конечности практически отсутствовали, цементный спейсер находился в месте введения.

В результате бактериологических исследований образцов патологических тканей и удаленных фрагментов спиц, отобранных в указанные сроки, в контрольной группе животных выявлено только два случая микробного загрязнения проб кожи и мышц посторонними микроорганизмами: в 4 из 65 исследуемых культур наблюдался рост микроорганизмов *Enterobacter sp.* или *Streptococcus sp.* В подавляющем большинстве случаев бактериальная культура из взятых образцов тканей животных из контрольной группы была отрицательной. В опытной группе крыс практически во все указанные сроки наблюдения бактериологические посева взятых образцов различных тканей и удаленных имплантатов (51 из 65) выявляли микробный рост. Идентификация выделенных микроорганизмов указывала на то, что изоляты являются штаммами *S. epidermidis*. Антибиотикограммы полученных штаммов и клинического штамма *S. epidermidis* 1341/12 полностью совпадали, что косвенно указывает на идентичность штаммов.

Таблица 3

**Клинические показатели состояния экспериментальных животных**

Группа животных	Показатели/сроки исследования, сутки											
	Масса тела, г				Объем оперированного бедра, см				Температура ректальная, t°			
	Исх.	7	14	28	Исх.	7	14	28	Исх.	7	14	28
Контрольная	243±15	<b>213±8</b>	<b>222±7</b>	<b>218±12</b>	1,21±0,08	<b>1,39±0,14</b>	1,27±0,05	1,27±0,07	37,6±0,3	37,8±0,4	37,5±0,4	37,7±0,3
n	13	13	10	5	13	13	10	5	13	13	10	5
Опытная	248±13	<b>203*±10</b>	<b>195*±9</b>	<b>172*±8</b>	1,23±0,06	<b>1,47*±0,06</b>	<b>1,62*±0,08</b>	<b>1,59*±0,11</b>	37,7±0,4	<b>38,5*±0,4</b>	<b>38,8*±0,4</b>	<b>38,4*±0,2</b>
n	13	13	10	5	13	13	10	5	13	13	10	5

Примечание: n – количество животных в группе; \* – отличается от контрольной группы ( $p < 0,05$ ); жирным шрифтом выделены значения, отличающиеся от дооперационного уровня ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4

**Лабораторные показатели состояния экспериментальных животных**

Группа животных	Показатели/сроки исследования, сутки											
	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> г/л				Нейтрофилы, %				Лимфоциты, %			
	Исх.	7	14	28	Исх.	7	14	28	Исх.	7	14	28
Контрольная	9,8±1,5	<b>12,2±1</b>	10,2±0,6	9,1±1,2	11±1,1	<b>14,7±1,2</b>	11,1±1,2	12,5±1,3	72,3±3	<b>68,3±1,3</b>	70,9±1,6	72,0±2
n	13	13	10	5	13	13	10	5	13	13	10	5
Опытная	9,3±1,2	<b>15,2*±1,6</b>	<b>20,6*±4,9</b>	<b>18,7*±3,4</b>	10,9±1,8	<b>19,3*±3,5</b>	<b>27,1*±9,4</b>	<b>20,8*±6,3</b>	73,2±2,2	<b>63,7*±3,5</b>	<b>53,9*±9,4</b>	<b>60,2*±6,3</b>
n	13	13	10	5	13	13	10	5	13	13	10	5

Примечание: см. табл. 3.

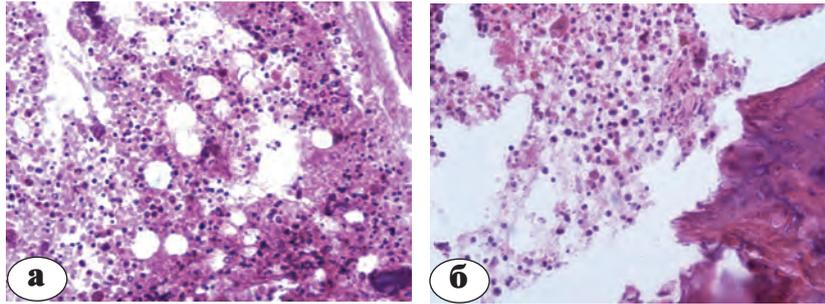
Результаты патоморфологического исследования представлены в таблице 5. Введение неинфицированного имплантата в костномозговой канал бедренной кости крыс привело к развитию асептического воспаления, которое стихало к 14-м суткам, сменяясь продуктивным. Происходящие в результате повреждения костномозговой центральной артерии некробиотические изменения эндостальной поверхности кортикальной пластинки также к 14-м суткам сменились явлениями остеогенеза. Несмотря на повторное оперативное вмешательство в объеме удаления спицы и установки цементного спейсера с гентамицином, к концу второй недели после ревизионной операции также начиналось восстановление структуры кроветворного костного мозга и формирование молодой костной ткани в свободной от спейсера области. Введение инфицированного имплантата с по-

следующей установкой цементного спейсера привело к выраженным морфологическим изменениям. К концу 4-й недели после инфицирования, несмотря на санацию гнойного очага с удалением инфицированной спицы, промыванием раны хлоргексидином и установкой антимикробного спейсера с гентамицином, у животных опытной группы развился остеомиелит с рассасыванием кортикальной пластинки и образованием многочисленных костных секвестров. Выраженные клинико-лабораторные и патоморфологические признаки инфекционно-воспалительного процесса наблюдались во все сроки исследования, указывая на то, что при отсутствии системной антибактериальной терапии санация гнойного очага с установкой антимикробного спейсера не приводит к купированию инфекционно-воспалительного процесса, вызванного штаммом MRSE.

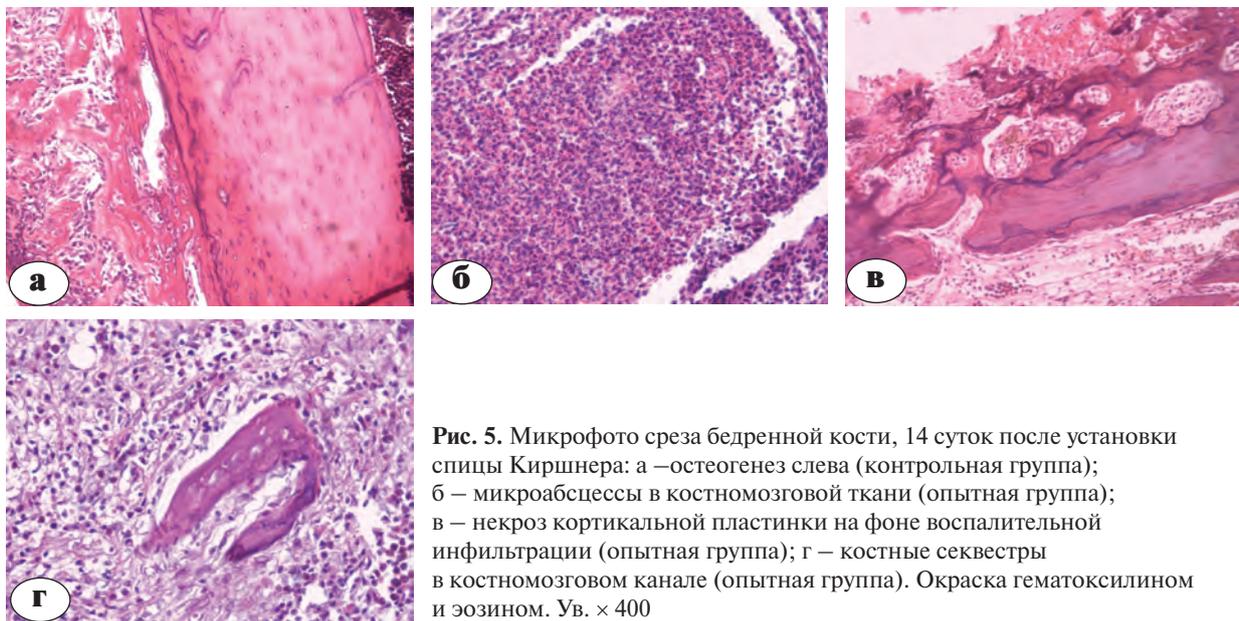
Таблица 5

**Сравнительная картина морфологических изменений области установки имплантатов, наблюдаемая у оперированных животных в разные сроки эксперимента**

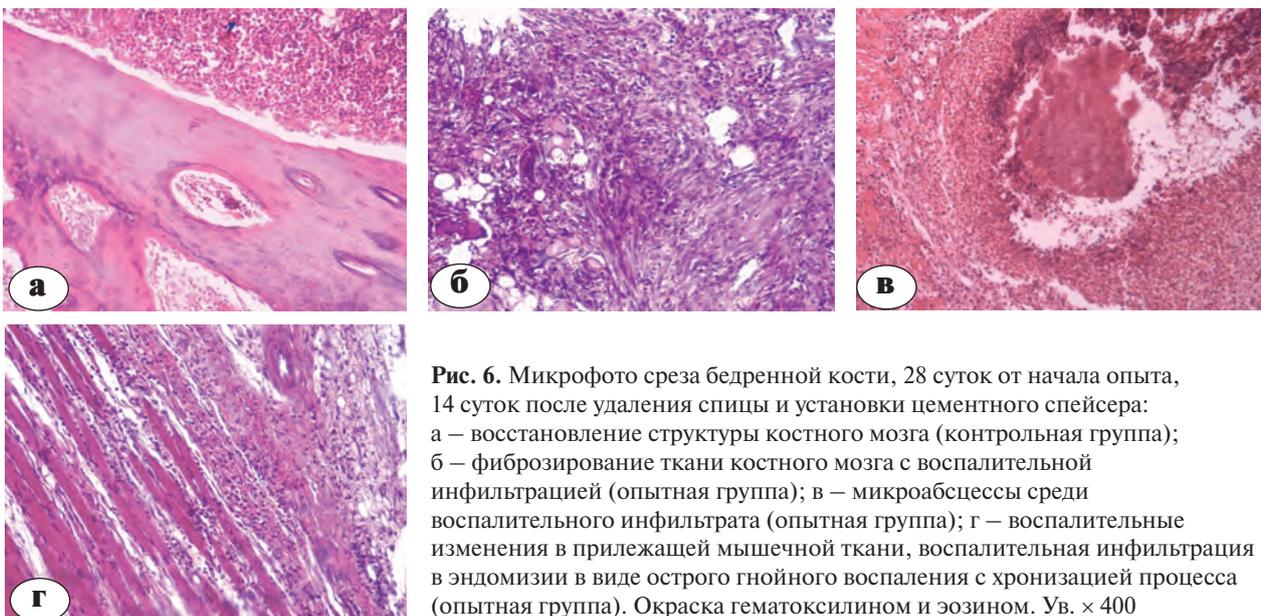
Срок	Группа	
	контрольная	опытная
7-е сутки	Признаки асептического реактивного воспаления в зоне внедрения спицы и окружающих тканях: нарушена структура кроветворного костного мозга, костномозговой канал заполнен воспалительным инфильтратом, представленным сегментоядерными лейкоцитами, макрофагами, гистиоцитами с примесью лимфоцитов и плазмоцитов (рис. 4 а)	В костномозговом канале признаки гнойного воспаления с обильной лейкоцитарной инфильтрацией. Костный мозг замещается воспалительным инфильтратом, в котором преобладают лейкоциты и макрофаги. В кортикальной пластинке в месте внедрения спицы – явления остеолита (рис. 4 б)
14-е сутки	В костномозговом канале происходит смена острой фазы воспаления на продуктивную – среди клеток воспалительного инфильтрата определяются фибробласты, лимфоциты и плазмоциты. Макрофаги сменяются гистиоцитами. В костной ткани отмечается увеличение зоны некробиоза в месте введения спицы, выражены явления остеогенеза – на периостальной стороне кортикальной пластинки формирование волокнистой губчатой кости (рис. 5 а)	В костномозговом канале выраженные явления гнойного воспаления с замещением костного мозга клеточным инфильтратом со сплошной лейкоцитарной инфильтрацией и формированием микроабсцессов (рис. 5 б). Костная кортикальная пластинка с признаками некроза – губель остеоцитов с обилием пустых клеточных лаун, расширение гаверсовых каналов (рис. 5 в). Наличие секвестров в костномозговом канале (рис. 5 г)
28-е сутки	Восстановление обычного строения кроветворного костного мозга на участках вне зоны установленного цементного спейсера (рис. 6 а). В кортикальной пластинке со стороны эндоста местами сохраняются расширенные гаверсовы каналы, наряду с этим имеются признаки регенерации и перестройки костной ткани с наличием участков молодой волокнистой кости и ярких линий склеивания, крупных остеоцитов в лакунах.	В костномозговом канале местами формируется грануляционная ткань со смешанной клеточной воспалительной инфильтрацией (рис. 6 б) и формированием микроабсцессов (рис. 6 в). Кортикальная пластинка резко истончена и фрагментирована из-за лизиса костной ткани воспалительным инфильтратом, в особенности, протеолитическими ферментами лейкоцитов. Отдельные костные секвестры располагаются среди клеток воспалительного инфильтрата. В окружающих мышцах и волокнистой ткани сохраняется смешанная воспалительная клеточная инфильтрация на фоне хронического воспаления (рис. 6 г)



**Рис. 4.** Микрофото среза костномозгового канала через 7 суток после установки спицы Киршнера: а – контрольная группа: стирание рисунка костного мозга, воспалительная инфильтрация; б – опытная группа: слева воспалительная инфильтрация, справа некроз и остеолиз эндостальной поверхности кости. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 400



**Рис. 5.** Микрофото среза бедренной кости, 14 суток после установки спицы Киршнера: а –остеогенез слева (контрольная группа); б – микроабсцессы в костномозговой ткани (опытная группа); в – некроз кортикальной пластинки на фоне воспалительной инфильтрации (опытная группа); г – костные секвестры в костномозговом канале (опытная группа). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 400



**Рис. 6.** Микрофото среза бедренной кости, 28 суток от начала опыта, 14 суток после удаления спицы и установки цементного спейсера: а – восстановление структуры костного мозга (контрольная группа); б – фибрирование ткани костного мозга с воспалительной инфильтрацией (опытная группа); в – микроабсцессы среди воспалительного инфильтрата (опытная группа); г – воспалительные изменения в прилегающей мышечной ткани, воспалительная инфильтрация в эндомизии в виде острого гнойного воспаления с хронизацией процесса (опытная группа). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 400

## Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что резистентность к метициллину, предопределяющая полирезистентность у 97,3% штаммов MRSE, может быть ведущим фактором вирулентности у *S. epidermidis*, ответственных за возникновение и развитие ГИОХВ после ортопедических операций. Наибольшая активность в отношении данных патогенов установлена у ванкомицина, линезолида и фосфомицина. Имеются также штаммоспецифические факторы вирулентности *S. epidermidis*: изоляты MRSE в 43,2% случаев обладают выраженной способностью к формированию биопленок, в то время как только 21,4% штаммов MSSE демонстрируют способность к биопленкообразованию в такой же степени. Однако это требует дальнейшего изучения, так как может быть связано с малым количеством изолятов MSSE, вошедших в настоящее исследование.

На разработанной экспериментальной модели было показано, что интраоперационное инфицирование имплантата полирезистентным клиническим штаммом MRSE привело к развитию остеомиелита у крыс в течение 4 недель после операции, несмотря на проведение санации гнойного очага и установку антимикробного цементного спейсера в область дефекта костной ткани. Предлагаемая модель имплантат-ассоциированной инфекции на животных подтверждена клиническими, лабораторными и патоморфологическими данными, что позволяет использовать ее для исследований, направленных на изучение этиологии и патогенеза инфекционных осложнений в травматологии и ортопедии, а также фармакологической эффективности антимикробных средств, различных биоматериалов с антибактериальными свойствами для лечения инфекции области хирургического вмешательства после ортопедических операций.

Таким образом, широкое естественное синантропное обитание штаммов *S. epidermidis* на кожных покровах и слизистых, наряду с высокой антибиотикорезистентностью и выраженной способностью к формированию микробных биопленок на биологических тканях и абиотических поверхностях, определяют этот вид стафилококков как клинически значимый этиологический фактор с высоким потенциалом и значительной вероятностью возникновения инфекций после крупных ортопедических операций.

## Литература

1. Божкова С.А. Современные принципы диагностики и антибактериальной терапии инфекции протезированных суставов. Травматология и ортопедия России. 2011; 61(3):126-136.

2. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Рукина А.Н. Ортопедическая имплантат-ассоциированная инфекция: ведущие возбудители, локальная резистентность и рекомендации по антибактериальной терапии. Травматология и ортопедия России. 2013; 70(4):5-15. Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Krasnova M.V., Rukina A.N. *Ortopedicheskaya implantat-assotsirovannaya infektsiya: vedushhie vozбудители, lokal'naya rezistentnost' i rekomendatsii po antibakterial'noj terapii* [Orthopedic implant-associated infection: the main etiological agents, local resistance and antimicrobial therapy recommendations]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2013; 70 (4):5-15
3. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Тишина В.В., Полякова Е.М., Торопов С.С. Профиль резистентности возбудителей как основа выбора эффективного антибиотика для терапии стафилококковой инфекции протезированного сустава. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер. 2013; 15(2): 115-123. Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Krasnova M.V., Rukina A.N., Tishina V.V., Polyakova E.M., Toropov S.S. *Profil rezistentnosti vozбудiteley kak osnova vibora effektivnogo antibiotika dlya terapii stafilokokkovoy infekcii protezirovannogo sustava* [Pathogens profiles of antimicrobial resistance as a basis for choice of effective antibiotic therapy of staphylococcal prosthetic joint infection]. *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* 2013; 15(2): 115-123.
4. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М. : ГЭОТАР МЕДИЦИНА; 2000. Sergienko V.I., Bondarev I.B. *Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyach* [Mathematical statistics in clinical studies]. М. GEOTAR MEDICINE; 2000.
5. Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудинина С.А., Кротова Л.А., Стерхова Г.В. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге. Антибиотики и химиотерапия. 1998; 7: 15-25. Sidorenko S.V., Rezvan S.P., Grudinina S.A., Krotova L.A., Sterkhova G.V. *Rezultaty mnogotsentrovogo issledovaniya chuvstvitel'nosti stafilocokkov k antibiotikam v Moskve i Sankt-Peterburge*. [Results of multicenteric research of staphylococci sensitivity to antibiotics in Moscow and St.-Petersburg] *Antibiotiki i khimioterapiya*. 1998; 7: 15-25.
6. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клинический микробиол. антимикроб. химиотер. 2012; 14(1): 51-58. Chebotar' I.V., Mayanskij A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. *Antibiotikorezistentnost' bioplynochnykh bakterij* [Antibioticoresistance of biofilm bacteria]. *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* 2012; 14(1):51-58.

7. Botelho A.M., Nunes Z., Asensi M.D., Gomes M.Z., Fracalanza S.E., Figueiredo A.M. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from hospital indoor air and a comparative analysis between airborne and inpatient isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1136-1145.
8. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:996-1006.
9. Dunne W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15:155-166.
10. Esteban J., Molina-Manso D., Spiliopoulou I., Cordero-Ampuero J., Fernández-Roblas R., Foka A., Gómez-Barrena E. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthopaedica.* 2010; 81(6):674 – 679.
11. European committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, 2011. Available from: URL: [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables/](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables/)
12. Mick V., Domínguez M A., Tubau F. et al. Molecular characterization of resistance to rifampicin in an emerging hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST228, Spain. *BMC Microbiology.* 2010, 10:68.
13. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009 ;7(8):555-567.
14. Schmolders J., Hischebeth G. TR, Friedrich M. J. et al. Evidence of MRSE on a gentamicin and vancomycin impregnated polymethyl-methacrylate (PMMA) bone cement spacer after two-stage exchange arthroplasty due to periprosthetic jointinfection of the knee. *BMC Infectious Diseases* 2014, 14:144.
15. Trampuz A., Piper K.E., Jacobson M.J. et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N. Engl. J. Med.* 2007;357: 654-663.
16. Uçkay I., Pittet D., Vaudaux P., Sax H., Lew D., Waldvogel F. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann. Med.* 2009;41(2):109-119.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

**Божкова Светлана Анатольевна** – к.м.н. заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии; *Bozhkova Svetlana A.* – the head of the research department of prevention and treatment of wound infection and Department of clinical pharmacology; e-mail: [clinpharm-miito@yandex.ru](mailto:clinpharm-miito@yandex.ru)

**Богданова Татьяна Яковлевна** – к.м.н. ведущий научный сотрудник научного отделения профилактики и лечения раневой инфекции; *Bogdanova Tatyana Y.* – leading researcher of department of prevention and treatment of wound infection, [tybogdanova@miito.ru](mailto:tybogdanova@miito.ru)

**Краснова Маргарита Викторовна** – к.м.н. ведущий научный сотрудник научного отделения профилактики и лечения раневой инфекции; *Krasnova Margarita V.* – leading researcher of department of prevention and treatment of wound infection; e-mail: [m\\_kras@list.ru](mailto:m_kras@list.ru)

**Анисимова Лариса Осиповна** – врач-патологоанатом; *Anisimova Larisa O.* – the doctor pathologist; e-mail: [loanisimiva@miito.ru](mailto:loanisimiva@miito.ru)

**Нетько Георгий Иванович** – д.м.н. заведующий научным экспериментально-морфологическим отделением; *Netylko Georgy I.* – MD, head of research experimental-morphological department; e-mail: [doctornetylko@mail.ru](mailto:doctornetylko@mail.ru)

**Рукина Анна Николаевна** – младший научный сотрудник научного отделения профилактики и лечения раневой инфекции; *Rukina Anna N.* – junior researcher of the research Department of prevention and treatment of wound infection; e-mail: [anrukina@miito.ru](mailto:anrukina@miito.ru)

**Лю Бо** – аспирант; *Lyu Bo* – postgraduate student; e-mail: [info@miito.ru](mailto:info@miito.ru)

Рукопись поступила 06.06.2014