

Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* — ведущих возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции

С. А. Божкова, М. В. Краснова, Е. М. Полякова, А. Н. Рукина, В. В. Шабанова

ФГБУ «Российский НИИ травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Цель. Изучение *in vitro* способности к формированию микробных биопленок у штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции (ИАИ), в зависимости от источника выделения штамма, вида возбудителя и его чувствительности к метициллину.

Материал и методы. Изучены 241 штамм *S. aureus* и 153 штамма *S. epidermidis*, выделенные из тканевых биоптатов, аспиратов и с удаленных ортопедических конструкций от 321 пациента с ИАИ. Чувствительность к антибиотикам оценивали по критериям EUCAST, версия 1.3. Биопленкообразующую способность исследовали по методу G. D. Christensen (1985). При оптической плотности более 0,2 способность к формированию микробных биопленок оценивали как выраженную (БПО-1). Статистический анализ проводили с использованием Z-критерия.

Результаты. БПО-1 установлена у 40,9% исследованных штаммов. Доля сильных биопленкообразователей среди изолятов, выделенных с ортопедических конструкций, составила 60,9% для *S. epidermidis* и 43,3% для *S. aureus*. Штаммы обоих видов стафилококка, выделен-

ные из тканевых биоптатов и с поверхности конструкций, чаще чем у изолятов из аспиратов ($p < 0,05$) характеризовались выраженной способностью к формированию биопленки. Доля MRSA составила 30,7%, MRSE — 77,8%. Сильных биопленкообразователей среди штаммов MRSE было больше по сравнению с MRSA (47,9% vs 31,1%; $p < 0,05$). Доля метициллинорезистентных изолятов из биологического материала превысила таковую у штаммов с удаленных конструкций ($p < 0,01$).

Выводы. Среди *S. epidermidis* чаще встречаются сильные биопленкообразователи и метициллинорезистентные штаммы, однако прямой зависимости между этими свойствами не установлено. Выраженная способность к формированию микробных биопленок более характерна для *S. epidermidis*, чем *S. aureus*, а также для штаммов, выделенных с ортопедических конструкций и тканевых биоптатов, по сравнению с изолятами из аспиратов, вне зависимости от вида стафилококка.

Ключевые слова: имплант-ассоциированная инфекция, *S. aureus*, *S. epidermidis*, микробные биопленки, метициллинорезистентность.

Biofilm Formation by Clinical Isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in Prosthetic Joint Infection

S. A. Bozhkova, M. V. Krasnova, E. M. Polyakova, A. N. Rukina, V. V. Shabanova

Russian Research Institute of Traumatology and Orthopaedics named after R.R. Vreden, Saint-Petersburg, Russia

Objectives. In vitro study of biofilm forming capacity of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains, most common etiological agents of PJI following orthopedic surgeries, depending on source of strain, species of etiological agent and methicillin susceptibility.

Materials and methods. 241 *S. aureus* and 153 *S. epidermidis* strains, isolated from the tissue biopsies, the joint aspirates and removed orthopedic prosthesis in 2012 year from 321 patients with PJI were investigated. Antibiotic susceptibility was estimated according to EUCAST criteria, version 1.3. The biofilm forming capacity was tested according to Christensen's method (1985). When $OD \geq 0,2$ strains were considered as strong biofilm forming strains. Statistical analysis was performed with Z-criterion tested.

Results. 40,9% of strains were found to be strong biofilm forming strains. The most strong biofilm forming capacity was shown for 60,9% of *S. epidermidis* strains and 43,3% of *S. aureus* strains isolated from removed prosthesis. The strains of both species, isolated from tissue biopsies and removed *orthopedic implants* (OI),

possessed strong biofilm forming capacity more often than isolates from aspirates ($p < 0,05$). MRSA amounted to 30,7% and MRSE — 77,8%. The percentage of strong biofilm forming strains was more among MRSE strains compared to MRSA strains (47,9 vs 31,1%; $p < 0,05$). The percentage of MR strains, isolated from biological samples, was higher than one for strains from removed OI ($p < 0,01$).

Conclusion. *Staphylococcus* spp., etiological agents of PJI, in 40,9% causes possessed strong biofilm forming capacity. The strong forming biofilm strains and methicillin resistant strains were seen more often among *S. epidermidis* strains, but any correlation between these properties was not revealed. The strong biofilm forming capacity was more typical for *S. epidermidis* strains and also for strains from OI and tissue biopsies compared to isolates from aspirates irrespective of staphylococcus species.

Key words: prosthetic joint infection, *S. aureus*, *S. epidermidis*, microbial biofilms, MRSA, MRSE.

Введение

В настоящее время наиболее эффективным методом лечения заболеваний и травматических повреждений крупных суставов является их эндопротезирование. Число операций по замене крупных суставов постоянно растет: в 2003 г. в США было выполнено 220 000 артропластик тазобедренного сустава, а к 2030 г. ожидается увеличение числа аналогичных операций до 572 000 [1]. Вместе с тем, ни постоянное совершенствование техники оперативного вмешательства, ни применение современных антисептиков и дезинфектантов не уменьшают риск развития инфекционных осложнений в области установки эндопротеза. Частота инфекционных осложнений при первичном эндопротезировании составляет 0,2–2,5%, при ревизионной операции — 1,1–4,8%, а в случае ревизионного эндопротезирования у пациента с парапротезной инфекцией частота рецидива достигает 23,2–31,5% [2,3]. Искусственные суставы — одна из наиболее уязвимых групп имплантатов, для которых риск инфицирования сохраняется пожизненно, и, не в последнюю очередь, это обусловлено тем, что в присутствии инородного тела в 10 000 раз и более снижается минимальная абсцесс-продуцирующая

доза возбудителей инфекции, а сам макроорганизм становится более восприимчивым к бактериальным и грибковым инфекциям [4].

В последние десятилетия, благодаря исследованиям ученых в разных областях науки, удалось в значительной мере выяснить причины столь частой неэффективности антимикробной терапии инфекционных осложнений, возникающих в ортопедической имплантологии крупных суставов. Во многом это связывают со способностью микробных возбудителей параэндопротезной инфекции, в частности представителей рода *Staphylococcus*, формировать на имплантатах биопленки.

Существование в форме биопленок можно рассматривать как эффективную защитную стратегию бактерий. Микроорганизмы в составе биопленок (сессиальные формы) характеризуются множественной антибиотикорезистентностью и устойчивостью к воздействию иммунной системы макроорганизма [5]. Причины сниженной чувствительности сессиальных форм бактерий остаются предметом дискуссий. В условиях макроорганизма экзополисахаридный матрикс биопленки защищает бактерии от фагоцитоза нейтрофилами, стимулирует моно-

циты для продукции простагландина E, который подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, бласттрансформацию В-лимфоцитов, продукцию иммуноглобулинов и хемотаксис [6]. В клинических условиях это приводит к хронизации инфекционного процесса.

Планктонные клетки микробов характеризуются быстрой пролиферацией и распространением в новые локусы организма, в то время как для sessильных форм характерна «оседлость», специализация функций внутри биопленки и высокая фенотипическая резистентность, обусловленная медленным ростом с измененной физиологией и сниженным метаболизмом [7]. При стандартных режимах антибактериальной терапии биопленочная резистентность является одной из причин безуспешных попыток эрадикации бактерий, адгезированных на поверхности имплантатов [5, 8]. Кроме того, биопленки могут представлять собой постоянный источник персистирующих микробных клеток, время от времени высвобождающихся из матрикса биопленки и диссеминирующих в окружающие сустав и отдаленные ткани макроорганизма.

Существование возбудителей в составе биопленок затрудняет диагностику имплант-ассоциированной инфекции и снижает эффективность антибактериальной терапии. При обследовании пациентов с наличием эндопротеза или других металлоконструкций низкая информативность дооперационной бактериологической диагностики параэндопротезной инфекции обусловлена тем, что в исследуемом аспирате могут отсутствовать планктонные формы возбудителя, тогда как на поверхности имплантата сформирована биопленка с прочно внедренными в нее инфекционными агентами [9].

На сегодняшний день общепризнанно, что стафилококки — главные возбудители инфекции области хирургического вмешательства в травматологии и ортопедии, в том числе после эндопротезирования крупных суставов. Двум видам стафилококка — *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* — в этиологии параэндопротезной инфекции отводится ведущая роль, во многом обусловленная их способностью быстро формировать многоуровневые микробные биопленки на поверхности искусственных имплантатов [10, 11]. Этот процесс у стафилококков детерминируется продукцией внеклеточной субстанции — полисахаридного межклеточного адгезина и других представленных на поверхности микробных клеток факторов, которые способствуют адгезии бактерий к имплантатам и последующему образованию многослойных кле-

точных кластеров, дающих начало образованию биопленок [8].

В результате того, что число эндопротезирований крупных суставов постоянно увеличивается, возрастает и связанная с проблемой параэндопротезной инфекции актуальность исследования причин развития данного осложнения, а также необходимость разработки методов ранней диагностики и эффективных способов лечения. Все это требует изучения свойств возбудителей, в частности *Staphylococcus* spp., изолированных из биоматериалов и с удаленных имплантатов, и выяснения патогенетической роли сформированных ими биопленок.

Цель исследования — изучить *in vitro* способность к формированию микробных биопленок у штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* — возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции, в зависимости от источника выделения штамма, вида возбудителя и его чувствительности к метициллину.

Материал и методы

Исследование основано на изучении способности к *биопленкообразованию* (БПО) у 394 штаммов стафилококков (241 — *S. aureus* и 153 — *S. epidermidis*), выделенных из тканевых биоптатов, аспиратов и удаленных конструкций у 321 пациента, получавших лечение в клинике РНИИТО им. Р. Р. Вредена в 2012 г. по поводу *имплант-ассоциированной инфекции* (ИАИ) после предшествующих ортопедических операций (табл. 1).

Для бактериологического исследования образцов биологического материала использовали прямой посев на питательные среды. Исследование компонентов удаленных эндопротезов включало обязательную деструкцию микробной биопленки с помощью ультразвуковой обработки в течение 5 мин, при мощности 300 Вт и номинальной частоте 40 кГц, с целью получения взвеси sessильных микробных клеток для дальнейшего культурального исследования [12].

Видовую идентификацию штаммов выполняли с использованием микробиологического анализатора Vitek 2 (BioMerieux); выявление метициллинорезистентности осуществляли *диско-диффузионным методом* с использованием агара Мюллера–Хинтона и дисков с цефокситином — FOX 30 (Oxoid, Великобритания). Согласно критериям EUCAST, версия 1.3 (2011), резистентными считали штаммы с диаметром зоны подавления роста для *S. aureus* <22 мм, для *S. epidermidis* <25 мм [13].

Пленкообразующие свойства штаммов изучали по методу G.D. Christensen et al. [14] с минималь-

Таблица 1. Распределение пациентов по виду хирургического вмешательства, предшествующего развитию ИАИ

Хирургическое вмешательство	Количество пациентов (n=321)
Эндопротезирование тазобедренного сустава	184
Эндопротезирование коленного сустава	90
Остеосинтез костей голени	14
Эндопротезирование плечевого сустава	10
Спондилосинтез	10
Эндопротезирование локтевого сустава	9
Эндопротезирование голеностопного сустава	4

ными изменениями в собственной модификации. Суточную бульонную культуру *Staphylococcus* spp. (18 ч, 37 °С) стерильным питательным бульоном разводили до стандартной мутности 0,5 McFarland, разбавляли в 100 раз и полученную микробную взвесь (10^6 КОЕ/мл) по 150 мкл вносили в лунки стерильных 96-луночных микропланшет, соблюдая 4-кратные 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 °С, 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 4-кратных 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 способности к биопленкообразованию (БПО) составили $0,596 \pm 0,127$ и $0,052 \pm 0,018$ соответственно. По результатам измерения ОП штаммы были распределены на две группы в зависимости от их способности к биопленкообразованию: БПО-0 — слабые биопленкообразователи ($ОП < 0,2$) и БПО-1 — сильные биопленкообразователи ($ОП \geq 0,2$) [15].

Для достижения поставленной цели анализировали зависимость степени БПО от источника выделения штамма, вида стафилококка и чувствительности к метициллину. Статистическую обработку выполняли с помощью MS Office Excel, 2007 (Microsoft, США), для статистического анализа полученных данных использовали Z-критерий стандартного нормального распределения для оценки разности между долями [16]. Различия принимали за достоверные при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Эпидемиологическая характеристика исследуемых штаммов. Исследуемые штаммы стафилококков были выделены из различных источников: 77,2% изолятов — из биологического материала, включая биоптаты ($n=144$) и аспираты ($n=160$); 22,8% штаммов ($n=90$) — с удаленных ортопедических конструкций (эндопротезов, металлоконструкций, спейсеров). У половины всех исследуемых штаммов стафилококков выявлена устойчивость к метициллину. При этом из биологического материала метициллинорезистентные штаммы выделяли значительно чаще ($p < 0,01$), чем с ортопедических конструкций (53% vs 35,6%). Среди *S. aureus* метициллинорезистентные (MRSA) штаммы составили 30,7%, среди *S. epidermidis* метициллинорезистентные (MRSE) — 77,8%. Установлено (рис. 1), что с ортопедических конструкций, в сравнении с биологическим материалом, значительно чаще ($p < 0,01$) выделяли метициллиночувствительные *S. aureus* (MSSA) и реже — MRSE ($p < 0,01$).

Оценка способности биопленкообразования выделенных штаммов. В результате проведенного исследования выявлено, что выраженной способностью к формированию биопленок (БПО-1) обладали 40,9% исследованных штаммов. Стафилококки, выделенные из биоптатов и с удаленных ортопедических конструкций, в 1,5 раза чаще ($p < 0,01$)

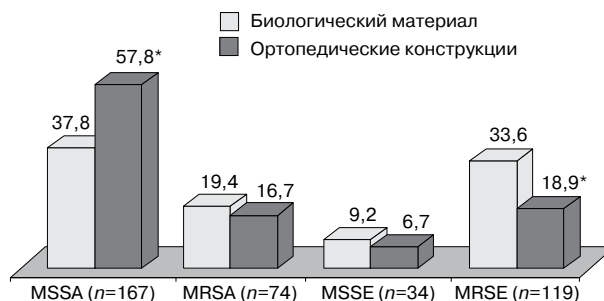


Рис. 1. Сравнительное распределение *S. aureus* и *S. epidermidis* в зависимости от источника выделения и чувствительности к метициллину, %

Примечание. * — $p < 0,01$ в сравнении с биологическим материалом

Таблица 2. Распределение штаммов *Staphylococcus* spp. (n=394) из различных источников по степени БПО

Степень БПО	Ортопедические конструкции	Тканевые биоптаты	Аспираты	Всего
	количество штаммов, % (n)			
БПО-0	52,2 (47)	52,8 (76)	68,7 (110)	59,1 (233)
БПО-1	47,8* (43)	47,2* (68)	31,3 (50)	40,9 (161)
Итого	100 (90)	100 (144)	100 (160)	100 (394)

Примечание. * – (p<0,01) по сравнению с долей сильных биопленкообразователей (БПО-1), выделенных из аспиратов

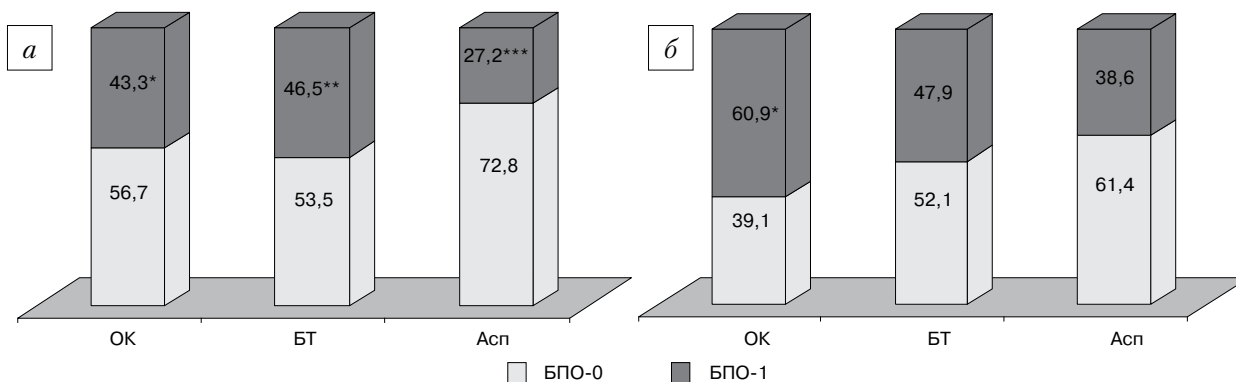


Рис. 2. Распределение по способности к БПО штаммов *S. aureus* (n=241) (а) и *S. epidermidis* (n=153) (б) из различных источников выделения, %: ОК – удаленные ортопедические конструкции; БТ – биоптаты тканевые; Асп – аспираты

* – p<0,05, по сравнению с долей изолятов с БПО-1, выделенных из аспиратов

** – p<0,01, по сравнению с долей изолятов с БПО-1, выделенных из аспиратов

*** – p<0,01, по сравнению с долей изолятов *S. epidermidis* с БПО-1, выделенных из того же источника

проявляли БПО-1, по сравнению с изолятами из аспиратов (табл. 2).

Анализ межвидовых различий по способности к биопленкообразованию, в зависимости от источника выделения возбудителей, показал (рис. 2, а и б), что среди изолятов с ортопедических конструкций штаммы *S. epidermidis* чаще, чем *S. aureus* (60,9% vs. 43,3%; p>0,05) демонстрировали БПО-1. Установлено также, что штаммы обоих видов стафилококков, выделенные из аспиратов, в подавляющем большинстве случаев характеризовались слабой способностью к формированию биопленки, в отличие от изолятов из тканевых биоптатов (p<0,05) и с ортопедических конструкций (p<0,05) (см. рис. 2, а и б).

В целом, штаммы *S. aureus* реже, чем *S. epidermidis* (p<0,01), демонстрировали БПО-1 (37,3%), при этом сильные биопленкообразователи среди MSSA встречались несколько чаще (рис. 3), чем среди MRSA (40,1% vs 31,1%, p>0,05). В то же время, выраженная способность к формированию биопленки, вне зависимости от чувствительности к метициллину, установлена у 46,4% изолятов *S. epidermidis*. Межвидовой сравнительный анализ показал, что сильных биопленкообразователей среди штаммов MRSE было достоверно больше по сравнению с MRSA (47,9% vs 31,1%; p<0,05).

Обсуждение результатов

S. aureus и *S. epidermidis* являются наиболее распространенными возбудителями инфекций в ортопедической имплантологии [17,18]. Представители *S. aureus* обладают множеством факторов вирулентности, ответственных за быстрое развитие инфекционного процесса, и часто являются резистентными или полирезистентными к антибиотикам [19]. В силу этих обстоятельств, многие десятилетия *S. aureus* находится в фокусе пристального внимания ученых и практических врачей всего мира. И только в последнее десятилетие появилось понимание истинной роли коагулазонегативных стафилококков (КНС) и их значения в развитии послеоперационных инфекционных осложнений, в частности ИАИ в травматологии и ортопедии.

Представители КНС, главным образом *S. epidermidis*, в отличие от *S. aureus*, обладают минимальным набором факторов вирулентности. Кроме того, являясь комменсалами, они в значительном количестве населяют кожные покровы и слизистые оболочки организма [20], в связи с чем до недавнего времени штаммы *S. epidermidis*, выделенные при бактериологической диагностике инфекционных осложнений, расценивали как контаминанты,

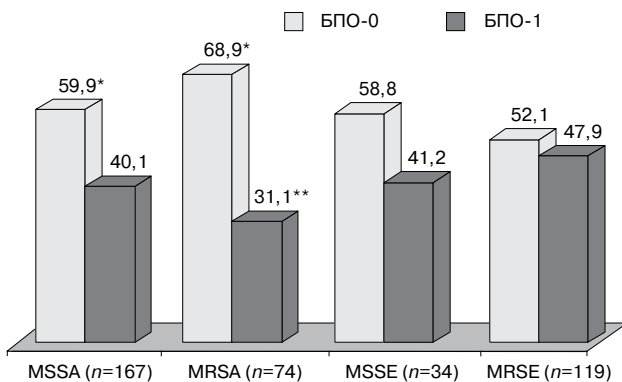


Рис. 3. Распределение штаммов *Staphylococcus* spp. ($n=394$) по способности к БПО в зависимости от вида и чувствительности к метициллину, %.

Примечание. * – ($p<0,01$) в сравнении с долей БПО-0 в той же группе;

** – ($p<0,05$) в сравнении с долей БПО-1 в группе MRSE.

а не как возбудители. Однако все более широкое использование различных медицинских изделий и биоматериалов, внедряемых в организм человека, привело к накоплению значительного количества фактов, свидетельствующих о причастности *S. epidermidis* к биоматериал-ассоциированным инфекциям. В результате ряда исследований было показано, что способность *S. epidermidis* образовывать биопленки является мощным фактором вирулентности, определяющим на сегодняшний день этиологическое лидерство *S. epidermidis* в имплант-ассоциированных инфекциях [21, 22].

По данным зарубежной научной литературы, еще в прошлом десятилетии резистентность *S. epidermidis*, возбудителей нозокомиальных инфекций, к бета-лактамам составляла 37–60% [23, 24]. Таким образом, *S. epidermidis* освоили нозокомиальную среду в качестве новой экологической ниши и превратились в возбудителя, заслуживающего особого внимания, что подтверждается результатами нашего исследования, в котором установлено двукратное преобладание количества резистентных к метициллину клинических штаммов *S. epidermidis*, в сравнении с количеством аналогичных изолятов *S. aureus* (77,8 и 30,7% соответственно).

В настоящее время среди нозокомиальных штаммов *S. epidermidis* выявлено лишь ограниченное число эпидемических клонов, основная часть которых принадлежит большому клональному комплексу CC2 [20]. Эти штаммы являются носителями различных кассет *SCCmec*, детерминирующих метициллинорезистентность и характеризующихся выраженной способностью формировать биопленки, в том числе на изделиях медицинского назначения, что также можно отнести к одному из

механизмов неспецифической резистентности [21]. Кроме того, по мнению некоторых исследователей, *S. epidermidis* может представлять собой резервуар генов, которые в случае горизонтального переноса могут усиливать патогенный потенциал *S. aureus* [25, 26].

В результате скрининга способности стафилококков к формированию биопленок выявлено, что 40,9% (161/394) штаммов, включенных в настоящее исследование, являлись сильными биопленкообразователями (см. табл. 2). В свою очередь, стафилококковые изоляты из тканевых биоптатов и с удаленных ортопедических конструкций характеризовались интенсивной продукцией биопленки почти в половине случаев (47,2 и 47,8% соответственно), тогда как штаммы, выделенные из аспиратов, значимо реже ($p<0,01$) демонстрировали выраженную способность к БПО (31,3%). По-видимому, это может быть связано с тем, что из аспиратов чаще выделяются планктонные формы штаммов, не обладающие достаточной способностью к формированию микробных пленок.

Межвидовой сравнительный анализ распределения штаммов стафилококков по способности к БПО и в зависимости от источника выделения показал (см. рис. 2), что обнаруженные в аспиратах и на ортопедических конструкциях штаммы *S. epidermidis* чаще аналогичных изолятов *S. aureus* ($p<0,01$) характеризуются выраженной способностью к БПО. Процентное соотношение количества штаммов с разной степенью БПО, из числа выделенных из тканевых биоптатов, практически совпадает у изолятов обоих видов. Тот факт, что штаммы *S. epidermidis*, в том числе изолированные из биологических образцов, проявляют более интенсивное БПО, вероятно, можно объяснить способностью *S. epidermidis* к формированию биопленок, даже в случае отсутствия *ica* оперона в их геноме [27]. Некоторым исследователям удалось установить, что у клинически значимых штаммов *S. epidermidis* биопленкообразование является многофакторным процессом, и в *in vivo* условиях агрессивная для стафилококков внешняя среда, не благоприятствующая условиям роста, вынуждает данных возбудителей к формированию биопленки для своей защиты, что, возможно, также играет роль в патогенезе ИАИ [28, 29].

В целом, штаммы *S. aureus*, включенные в исследование, в большинстве случаев характеризовались слабой способностью к БПО, вне зависимости от того, были они выделены с металлоконструкций или из биологических образцов: 57% и 65% соответственно. Несмотря на это, нельзя преуменьшать их роль в патогенезе ИАИ. Участие *S. aureus* в инфек-

циях, связанных с формированием микробных биопленок, требует заведомо более интенсивного лечения. Как правило, такие инфекции очень трудно поддаются антибиотикотерапии, и эндопротезы, инфицированные штаммами *S. aureus*, подлежат удалению чаще, чем инфицированные штаммами *S. epidermidis*, что может быть обусловлено наличием у *S. aureus* большего количества факторов патогенности, приводящих к более ярким клиническим проявлениям инфекционного процесса и распространению инфекционного агента в другие локусы организма человека, вызывая в ряде случаев генерализацию инфекции [24].

В настоящем исследовании к метициллину были резистентны 49% штаммов стафилококков. При этом из биологического материала метициллинорезистентные штаммы выделяли значительно чаще ($p < 0,01$), чем с ортопедических конструкций (53% vs 35,6%). По-видимому, изолятам с удаленных конструкций пленкообразующие свойства присущи в большей степени, нежели метициллинорезистентность. Это может быть обусловлено, с одной стороны, повышенной тропностью сильных пленкообразователей к искусственным поверхностям имплантатов, с другой стороны, большей частотой инфицирования мягких тканей госпитальными метициллинорезистентными штаммами стафилококков. В настоящее время показано, что данные, полученные при обычном тестировании планктонных микробных клеток, не отражают истинного уровня резистентности бактерий. Бактерии, растущие в составе биопленок, оказываются в 100–1000 раз менее чувствительны к антибиотикам, чем планктонные формы [5]. В клинической практике это приводит к тому, что антимикробные препараты, активные в отношении планктонных бактерий, не обеспечивают эрадикации возбудителя у пациентов с инфицированными эндопротезами. Однако до настоящего времени не существует стандартизированных методов оценки антибиотикочувствительности биопленочных форм стафилококков, которые можно использовать в рутинной клинической практике.

В результате исследования нам не удалось выявить значимой связи между метициллинорезистентностью и способностью к БПО у штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных при ортопедических инфекциях: сильными биопленкообразователями являлись 41,5% штаммов чувствительных и 40,9% — резистентных к метициллину. Анализ с учетом вида показал (см. рис. 3), что выраженную способность к БПО штаммы MRSE проявляли почти в половине случаев, в то время как

среди MRSA такие штаммы составили менее трети ($p < 0,05$). Метициллиночувствительные *S. aureus* и *S. epidermidis* практически не отличались по доле изолятов с выраженной способностью к БПО: 40,1 и 41,2% соответственно. Подобные результаты приведены в исследовании К. Smith с соавт., в котором авторы указывают на отсутствие корреляции ($p = 0,77$) между чувствительностью штаммов *S. aureus* к метициллину и их пленкообразующей способностью [30]. Авторы предполагают, что способность формировать биопленку скорее зависит от источника выделения штамма. Этот тезис вполне подтвердился в нашем исследовании: изоляты с удаленных протезов и биопатов тканей обоих видов стафилококка проявляли значимо более выраженную способность к БПО по сравнению с изолятами из аспиратов (см. рис. 2). Единого мнения в этом вопросе на сегодняшний день нет. Некоторые авторы подчеркивают, что у экзополисахарид-продуцирующих штаммов достоверно чаще отмечается резистентность к аминогликозидам, сульфаметоксазолу и ципрофлоксацину и встречается полирезистентность к антибиотикам [23]. Однако очевидно, что каждый случай выявления выраженной биопленкоформирующей способности у метициллинорезистентных стафилококков предполагает более сложную антибиотикотерапию и меньшие шансы на ее успех.

Выводы

Стафилококки, возбудители ортопедической имплант-ассоциированной инфекции, в 40,9% случаев являлись сильными биопленкообразователями.

Резистентность к метициллину выявлена у 30,7 и 77,8% исследованных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* соответственно. Метициллинорезистентные штаммы выделялись значительно чаще ($p < 0,01$) из биологического материала, чем с удаленных ортопедических конструкций: в 53 и 35,6% случаев соответственно.

Выраженной способностью к формированию микробных биопленок характеризовались 37,3% изолятов *S. aureus* и 46,4% *S. epidermidis*.

Способность к формированию биопленок у стафилококков зависит от источника выделения штамма и значительно чаще определяется у изолятов из тканевых биопатов и с удаленных ортопедических конструкций. Штаммы обоих видов стафилококка, выделенные из аспиратов, в подавляющем большинстве случаев характеризуются слабым БПО.

Наиболее часто сильные биопленкообразователи встречались среди изолятов *S. epidermidis* с удаленных ортопедических конструкций (60,9%).

Литература

- Lee K., Goodman S.B. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. *Expert Rev Med Devices* 2008; 5:383-93.
- Phillips C.B., Barrett J.A., Losina E., et al. Incidence rates of dislocation, pulmonary embolism, and deep infection during the first six months after elective total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(1):20-6.
- Lie S.A., Engesaeter L.B., Havelin L.I., Gjessing H.K., Vollset S.E. Dependency issues in survival analyses of 55,782 primary hip replacements from 47,355 patients. *Stat Med* 2004; 23:3227-40.
- Zimmerli W., Trampuz A., Biomaterials-associated infection: a perspective from the clinic. In: *Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies*; Moriarty T.F., Zaat S.A.J., Busscher H. eds.; Springer: NY, Heidelberg Dordrecht: London, ed. 2013; pp. 3-24.
- Raja A.F., Furqan A., Inshad A. Kh., et al. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiology* 2011; 11:1-9.
- de Haas C.J., Veldkamp K.E., Peschel A., et al. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med* 2004; 199:687-95.
- Jiang X., Pace J.L. Microbial Biofilms. In: *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*; Pace J.L., Rupp M., Finch R.G., eds.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006; p. 3-19.
- Lin M., Chang F., Hua M., Wu Y., Liu S. Inhibitory effects of 1,2,3,4,6-penta-O-Galloyl- β -D-glucopyranose on biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:1021-7.
- Zimmerli W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20:1045-63.
- Barberán J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 (Suppl 3):93-101.
- Brady R.A., Calhoun J.H., Leid J.G., Shirtliff M.E. Infections of orthopaedic implants and devices. In: *Biofilms and Device-Related Infections*. Shirtliff ME and Leid JG. eds.; Springer: NY, 2009; pp. 15-56.
- 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; 357:654-63.
- 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/
- Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., 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.
- Esteban J., Molina-Manso D., Spiliopoulou I., et al. Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses *Acta Orthopaedica* 2010; 81(6):674-9.
- Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000; С. 70-3.
- Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В. с соавт. Профиль резистентности возбудителей как основа выбора эффективного антибиотика при стафилококковых инфекциях протезированных суставов. *КМАХ* 2013; 15(2):115-23.
- Peel T.N., Cheng A.C., Buising K.L., Choonga P.F. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2386-91.
- Сидоренко С.В. Микробиологические аспекты хирургических инфекций. *Инфекции в хирургии* 2003; (1):22-7.
- Fey P.D., Olson M.E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 2010; 5:917-33.
- Schoenfelder S.M., Lange C., Eckart M., et al. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:380-6.
- Ziebuhr W., Hennig S., Eckart M., et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28 (Suppl 1):14-20.
- Arciola C.R., Campoccia D., Gamberini S., et al. Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* 2005; 26:6530-5.
- Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 322:207-28.
- Bloemendaal A.L.A., Brouwer E.C., Fluit A.C. Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *PLoS ONE* 2010; 5(7):e11841.
- Otto M. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: Staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2013; 35:4-11.
- O'Gara J.P., Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50:582-7.
- McCann M.T., Gilmore B.F., Gorman S.P. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *JPP* 2008; 60:1551-71.
- Fitzpatrick F., Humphreys H., Smyth E.G., et al. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J hospital infection* 2002; 52:212-8.
- Smith K., Perez A., Ramage G., et al. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2008; 57:1018-23.