

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНОВ АМИНОГЛИКОЗИДОМОДИФИЦИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Полякова Е.М.<sup>1</sup>, Гурбанова А.Б.<sup>1</sup>, Лабути Д.А.<sup>1</sup>, Божкова С.А.<sup>1</sup>, Гордина Е.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, e-mail: kate\_alex.07@mail.ru

Имплантат-ассоциированная инфекция (ИАИ) является одним из серьезнейших осложнений ортопедической хирургии. Пациентам с ИАИ, как правило, хирургическое вмешательство выполняют в два этапа, первый из которых включает санацию гнойного очага, удаление инфицированного имплантата и замещение сформированных в ходе операции костных дефектов индивидуальной конструкцией из костного цемента – спейсером, содержащим в своем составе антибактериальный компонент. Одними из наиболее часто применяемых в составе костного цемента являются препараты из класса аминогликозидов – гентамицин и тобрамицин. Эффективность данной тактики ведения пациентов напрямую зависит от чувствительности инфекционного агента к антибиотику в составе спейсера. Цель исследования – выявление генов и их ассоциаций, кодирующих аминогликозидомодифицирующие ферменты, у штаммов *S. aureus* с фенотипической устойчивостью к аминогликозидам, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией. Изучено 268 культур *S. aureus*, выделенных от пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией. Антибиотикочувствительность изолятов изучали диско-диффузионным методом, в соответствии с требованиями EUCAST. Наличие генов АМФ у культур с фенотипической устойчивостью к аминогликозидам определяли методом ПЦР. Анализ полученных данных выполнен с помощью критерия Фишера. Оценена чувствительность изолятов *S. aureus* к гентамицину, амикацину и тобрамицину. Выявлена взаимосвязь между фенотипической устойчивостью изученных штаммов к гентамицину и тобрамицину и наличием в их геноме генов *aac(6')-Ie/aph(2'')* и *aac*. Ген *antI* регистрировали в случаях устойчивости *S. aureus* к гентамицину и тобрамицину. У всех устойчивых штаммов был выявлен ген *aac(6')-Ie/aph(2'')*. Полученные результаты демонстрируют, что гены *aac(6')-Ie/aph(2'')* и *aac* являются детерминантами устойчивости *S. aureus* к гентамицину и тобрамицину при перипротезной и имплант-ассоциированной инфекциях. Быстрое, качественное определение наличия генов АМФ у *S. aureus* методом ПЦР на этапе выбора состава спейсера является необходимым компонентом подбора эффективной локальной антибактериальной терапии.

Ключевые слова: аминогликозидомодифицирующие ферменты, *S. aureus*, имплант-ассоциированная инфекция, перипротезная инфекция.

## THE PREVALENCE OF AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING ENZYME GENES AMONG STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ISOLATED FROM ORTHOPEDIC PATIENTS

Polyakova E.M.<sup>1</sup>, Gurbanova A.B.<sup>1</sup>, Labutin D.A.<sup>1</sup>, Bozhkova S.A.<sup>1</sup>, Gordina E.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Saint Petersburg, e-mail: kate\_alex.07@mail.ru

Implant-associated infection is one of the most serious complications of orthopedic surgery. For patients with implant-associated infection surgical intervention is performed in two stages, the first of which includes sanitation of a purulent focus, removal of an infected implant and replacement of bone defects formed during the operation with an individual bone cement structure – a spacer containing an antibacterial component. Some of the most commonly used in the composition of bone cement are drugs from the class of aminoglycosides – gentamicin and tobramycin. The effectiveness of this tactic of patient management directly depends on the susceptibility of the infectious agent to the antibiotic in the spacer. The aim of the study was to identify genes and their associations encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *S. aureus* strains with phenotypic resistance to aminoglycosides isolated from patients with orthopedic infection. A total of 268 cultures of *S. aureus* isolated from patients with implant-associated infection were studied. The antibiotic susceptibility of the isolates was studied by the disk diffusion method in accordance with the EUCAST requirements. The presence of AME genes in cultures with phenotypic resistance to aminoglycosides was determined by PCR. The analysis of the data obtained was carried out using the Fisher test. Antibiotic susceptibility was tested to gentamicin, amikacin, and tobramycin. There was a strong association of *aac(6')-Ie/aph(2'')* and *aac* genes with phenotypic resistance to all

**three antibiotics. These results demonstrate aac(6')-Ie/aph(2'') and aac as determinants of *S. aureus* aminoglycoside resistance in orthopedic implant-associated infection.**

Keywords: aminoglycoside-modifying enzyme, *S. aureus*, implant-associated infection, prosthetic joint infection.

Эндопротезирование – распространенный высокоэффективный метод лечения дегенеративных заболеваний крупных суставов верхних и нижних конечностей, который широко используется в стационарах РФ. Несмотря на применение современных антисептических и антибактериальных средств, усовершенствованных металлоконструкций и техники оперативного вмешательства, частота развития имплант-ассоциированной и перипротезной инфекций остается неизменной [1]. Перипротезная инфекция (ППИ) как осложнение эндопротезирования является второй по частоте причиной ревизии эндопротезов тазобедренного сустава, а ее частота составляет около 1% после первичных вмешательств и до 4% после ревизионных операций.

Представители рода *Staphylococcus* являются одними из основных возбудителей ортопедической инфекции с широким набором факторов патогенности. Наиболее проблемными и затратными для лечения являются инфекции, вызванные метициллин-резистентными *S. aureus* (MRSA). Несмотря на высокую природную чувствительность стафилококков к подавляющему большинству антибиотиков, антибактериальная терапия ППИ может представлять серьезную проблему из-за формирования биопленок на поверхности имплантатов и механизмов антибиотикорезистентности [1], именно поэтому в современных условиях необходима разработка новых альтернативных методов борьбы с инфекционными агентами. Кроме того, *S. aureus* характеризуются разнообразными механизмами персистенции, включая секретируемые токсины, способностью уклоняться от иммунной системы макроорганизма и развитием устойчивости к противомикробным препаратам. В результате этих высокоразвитых патогенных механизмов персистенции клинические рецидивы ортопедической инфекции, вызванной *S. aureus*, остаются значимой проблемой.

В профилактике развития любой имплант-ассоциированной инфекции ключевым моментом является предупреждение микробной адгезии и формирования микробного очага. При первичном эндопротезировании «первая линия обороны» – это антибактериальные препараты в качестве периоперационной антибиотикопрофилактики. Кроме того, некоторые исследователи рекомендуют применение антибиотиков в составе костного цемента, которым фиксируют компоненты эндопротеза, что, по их мнению, обеспечивает первоначальный защитный барьер против инфицирования эндопротезов.

С 1970 г. в качестве локальной антибактериальной терапии при различной ортопедической патологии используют костный цемент на основе полиметилметакрилата с

добавлением гентамицина. Применение спейсеров, состоящих из костного цемента с гентамицином, в течение периода проведения локальной антибиотикотерапии в области тазобедренного сустава в большинстве случаев позволяет предупредить развитие инфекционного процесса [2, 3]. Причиной развития данного осложнения в большинстве случаев является интраоперационное инфицирование.

Для местной профилактики и лечения инфекционных осложнений используют добавление антибиотиков группы аминогликозидов, в частности гентамицина и тобрамицина, в костный цемент, который применяют для фиксации компонентов эндопротезов у пациентов с остеопорозом, или в качестве антимикробных спейсеров для замещения дефектов костной ткани при лечении перипротезной инфекции и остеомиелита [2–4]. При этом, как правило, гентамицин является компонентом официального костного цемента, а тобрамицин добавляют *ex tempore* при интраоперационном изготовлении спейсеров. Однако, несмотря на доказанную эффективность метода, возникновение ППИ остается серьезной проблемой в лечении ортопедических пациентов [5]. Для корректной локальной терапии ППИ необходимы своевременная диагностика и четкая стратегия лечения с учетом возможной резистентности возбудителя к антибактериальным препаратам.

Аминогликозиды обладают широким спектром действия, эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Основным механизмом устойчивости у бактерий к аминогликозидам является продукция аминогликозидомодифицирующих ферментов (АМФ) [6]. Модифицированные молекулы антибиотика теряют способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка. Определенное клиническое значение имеет распространение среди грамположительных бактерий бифункционального фермента AAC(6')-APH (2"), разрушающего большинство клинически значимых аминогликозидов (кроме стрептомицина и спектиномицина) [7]. Гены АГМФ локализируются на мобильных генетических элементах, что обуславливает их быстрое распространение. Устойчивость к гентамицину является маркером наличия этого фермента у конкретного штамма, так как другие ферменты, распространенные среди грамположительных бактерий, не инактивируют этот антибиотик [7].

В литературе все чаще встречаются сообщения о повышении устойчивости грамположительных кокков к аминогликозидам и неэффективности цемента, импрегнированного аминогликозидами, при двухэтапной ревизии [8]. В свою очередь, гены устойчивости к антибиотикам, такие как *tesA*, *vanA*, *bla<sub>OXA</sub>* и другие, давно используются в качестве маркеров фенотипической устойчивости в анализах на основе ПЦР [9].

Аналогичные тест-системы с возможностью определения детерминант

резистентности к аминогликозидам помогут клиницистам в момент выбора антибактериального препарата в составе спейсера для эффективной местной терапии ППИ.

Цель исследования – оценить наличие и распространенность генов и их ассоциаций, кодирующих аминогликозидомодифицирующие ферменты, у штаммов *S. aureus* с фенотипической устойчивостью к аминогликозидам, выделенных от пациентов с ортопедической инфекцией.

### Материалы и методы исследования

*Микробиологические методы.* Выполнено исследование 268 культур *S. aureus*, выделенных от пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией, из них 59,7% ( $n=160$ ) – с перипротезной инфекцией. Изоляты были извлечены из биопленок, сформированных патогенами на поверхности имплантатов, и интраоперационных тканевых биоптатов. Наличие плазмокоагулазы у тестируемых штаммов изучали с использованием сухой кроличьей плазмы («Микроген», Россия). Видовую идентификацию осуществляли на панелях Microplate («Erba Lachema») с помощью iEMS Reader MF («Labsystems», Финляндия). Антибиотикочувствительность изолятов изучали диско-диффузионным методом, в соответствии с требованиями EUCAST [10]. Для этого взвесь суточных культур *S. aureus* в стационарной фазе роста наносили ватным тампоном на поверхность агара Мюллера–Хинтона (МХА) и через 5 мин вносили диски с гентамицином (нагрузка 10 мкг), амикацином (30 мкг) и тобрамицином (10 мкг) производства «Oxoid» (Великобритания). Чашки инкубировали при 35°C 18–24 ч и оценивали зону задержки роста в миллиметрах [10].

*Молекулярно-генетические методы.* Бактериальную ДНК выделяли с использованием набора «S-Sorb» («Синтол», Россия) и измеряли с использованием набора Qubit DNA на флуорометре «Qubit 3.0» («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР проводили на амплификаторе «CFX96 Touch» («Bio-Rad», США) с использованием реагентов производства компании «Синтол» (Россия). Реакционный объем составлял 25 мкл. Параметры циклирования: 95°C в течение 3 мин и 33 цикла в 3 последовательных этапа: 95°C в течение 10 с, 55°C в течение 15 с и 72°C в течение 15 с. Праймеры были разработаны с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (табл. 1). Конечные продукты ПЦР визуализировали в 1,0%-ном агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом.

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Направление и последовательность праймера (5'→3')	Размер продукта, п.н.
-----	---	-----------------------

<i>aac(6')-Ie/aph(2'')</i>	Прямой	TGCCACACTATCATAACCAC	102
	Обратный	GCCACAAATGTTAAGGCAAT	
<i>aac</i>	Прямой	CATGGCAAGCTCTAGGATT	323
	Обратный	GGCTGAGTTTATGGAAGAAG	
<i>ant(4')-Ia</i>	Прямой	GTTTGGGCTTCTACCGATTT	121
	Обратный	CTCAGGTGGAATCAGATTGG	
<i>ant1</i>	Прямой	GGTGGTTTACGCATTAACAG	479
	Обратный	TCACCAGTAGTCACTGTTTG	

*Статистический анализ.* Данные анализировали при помощи критерия Фишера (F-тест) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0. Статистически значимыми принимали значения  $p$  менее 0,05.

**Результаты исследования и их обсуждение.** В исследование были включены 268 культур, выделенных от пациентов с имплант-ассоциированной и перипротезной инфекциями, а также остеомиелитом. Из 268 изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов ортопедического профиля, 58,6% ( $n=157$ ) были резистентны к цефокситину (MRSA), 41,4% ( $n=111$ ) – чувствительны (MSSA).

Анализ чувствительности выделенных бактериальных культур к аминогликозидам показал, что 75,8% штаммов MRSA ( $n=119$ ) демонстрировали устойчивость к гентамицину и тобрамицину, 24,2% ( $n=38$ ) – чувствительность. 65,0% ( $n=104$ ) и 6,3% ( $n=10$ ) штаммов были устойчивыми и умеренно резистентными к амикацину соответственно. Чувствительностью к амикацину характеризовались 28,7% изолятов MRSA ( $n=45$ ) ( $p<0,0001$ ). Одновременная устойчивость ко всем трем антибиотикам была выявлена только у 28% штаммов MRSA ( $n=44$ ). Среди штаммов MSSA только три были устойчивы к гентамицину и тобрамицину, два штамма – к амикацину.

Ранее Samrossia et al. продемонстрировали, что частота встречаемости гена *aac(6')-Ie/aph(2'')* у изолятов *S. epidermidis*, выделенных от пациентов ортопедического профиля, составила 44% [11]. Авторы также сообщили о снижении (7%) распространенности *ant(4')-Ia* среди культур, выделенных от пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией.

В своем исследовании B. Fatholahzadeh et al. показали, что чувствительность штаммов MRSA составила: канамицин 97%; тобрамицин 96%; энтамицин 87%; амикацин 93%. Наиболее распространенными генами аминогликозидомодифицирующих ферментов были *aac(6')-Ie-aph(2'')* (83%) и *ph(3')-IIIa* (71%). Сосуществование трех генов АМФ обнаружено в

21% случаев. Наименее часто у изолятов регистрировали ген *ant(4')-Ia*. Полученные результаты согласовались с результатами тестирования чувствительности данных культур MRSA к аминогликозидам диско-диффузионным методом [12].

В нашем исследовании ген *aac(6')-Ie/aph(2'')* был выявлен у 45,5% штаммов *S. aureus* ( $n=122$ ), гены *aac* и *ant1* – у 27,2% ( $n=73$ ) и 18,3% ( $n=49$ ) соответственно. Ген *ant(4')-Ia* обнаружен не был.

Процент изолятов, содержащих в своем геноме гены АМФ, был существенно выше среди штаммов MRSA по сравнению со штаммами MSSA: *aac(6')-Ie/aph(2'')* – 75,8% ( $n=119$ ) против 2,7% ( $n=3$ ) ( $p<0,0001$ ), *aac* – 45,9% ( $n=72$ ) против 0,9% ( $n=1$ ) ( $p<0,0001$ ), *ant1* – 23,6% ( $n=37$ ) против 10,8% ( $n=12$ ) ( $p=0,01$ ) соответственно (табл. 2). Высокая распространенность генов, кодирующих АМФ, может быть объяснена их ключевой ролью в резистентности к аминогликозидам [13].

Таблица 2.

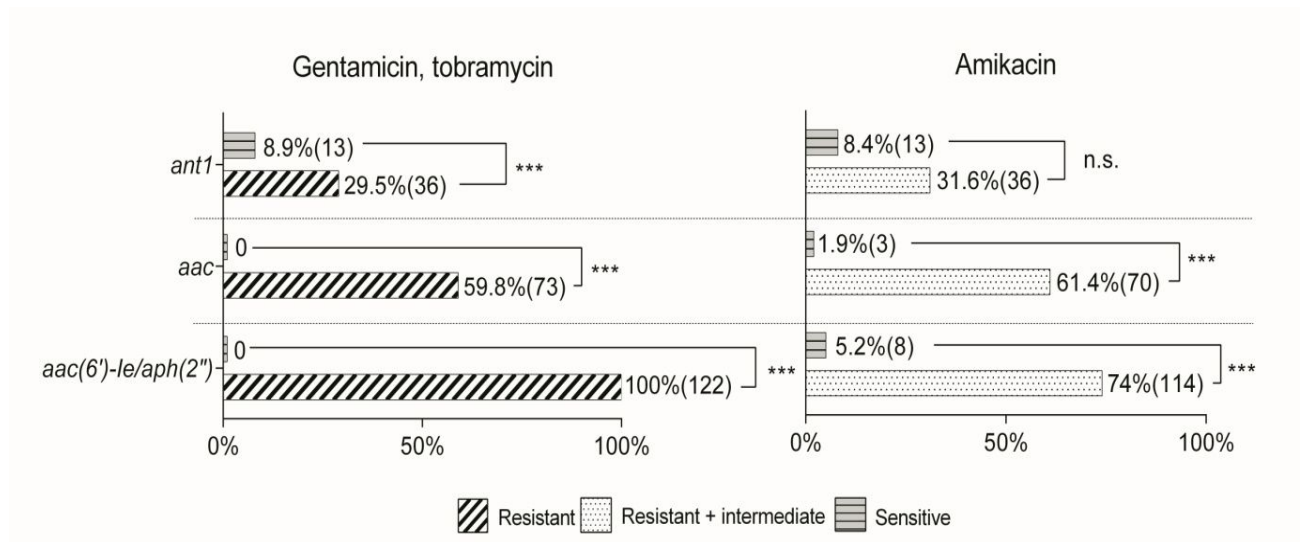
Частота встречаемости генов аминогликозидомодифицирующих ферментов среди *S. aureus* (%)

Ген АМФ	MRSA ( $n=157$ )	MSSA ( $n=111$ )	<i>p</i>
<i>aac(6')-Ie/aph(2'')</i>	75,8	2,7	<0,0001
<i>aac</i>	45,9	0,9	<0,0001
<i>ant1</i>	23,6	10,8	=0,01

Анализ данных о присутствии генов АМФ у исследованных штаммов *S. aureus* в зависимости от их чувствительности к гентамицину, тобрамицину и амикацину позволил выявить сильную взаимосвязь между наличием гена *aac(6')-Ie/aph(2'')* и их устойчивостью к гентамицину и тобрамицину.

Так, ген *aac(6')-Ie/aph(2'')* присутствовал в геноме всех изученных *S. aureus*, устойчивых к гентамицину и тобрамицину, и не был детектирован ни у одной бактериальной культуры, чувствительной к данным антибиотикам. В то же время в отношении амикацина результаты для данного гена были менее однозначными: ген *aac(6')-Ie/aph(2'')* был выявлен не только у 100% резистентных и умеренно резистентных к амикацину изолятов, но и у 5,2% ( $n=8$ ) чувствительных. В соответствии с представленными данными, ген *aac* присутствовал только у изолятов *S. aureus*, устойчивых к гентамицину и тобрамицину (59,8%,  $n=73$ ), и не был выявлен ни у одного из штаммов, чувствительных к тестируемому антибактериальным

препаратам. В то же время ген *aac* присутствовал в геноме 3 бактериальных культур, умеренно резистентных к амикацину (рисунок).



Распространенность генов аминогликозидомодифицирующих ферментов среди штаммов *S. aureus* в зависимости от их чувствительности к аминогликозидам

Ген *ant1* выявлен у 29,5% ( $n=36$ ) штаммов, устойчивых к гентамицину и тобрамицину, и у 8,9% ( $n=13$ ), чувствительных к данным антибиотикам.

В свою очередь, анализ комбинаций генов аминогликозидомодифицирующих ферментов в геноме изученных штаммов *S. aureus* показал, что у 50% изолятов, содержащих ген *aac(6')-Ie/aph(2'')*, также присутствовал ген *aac* ( $n=61$ ).

Следует отметить, что комбинация генов *aac(6')-Ie/aph(2'')* и *ant1* была выявлена у 20% культур ( $n=24$ ), и только 10% штаммов ( $n=12$ ) одновременно содержали в своем геноме все три гена.

Приведенные результаты подтверждают существенную значимость генов *aac(6')-Ie/aph(2'')* и *aac* в формировании резистентности *S. aureus* к гентамицину и тобрамицину в сравнении с геном *ant1* ( $p<0,0001$ ).

**Заключение.** Ген *aac(6')-Ie/aph(2'')* выявлен у 45,5% штаммов. Процент изолятов, содержащих в своем геноме гены АМФ, был существенно выше среди штаммов MRSA по сравнению со штаммами MSSA. Показана особая важность двух генов, кодирующих аминогликозидомодифицирующие ферменты, – *aac(6')-Ie/aph(2'')* и *aac* – как детерминант устойчивости *S. aureus* к гентамицину и тобрамицину при ортопедической инфекции. При этом роль гена *aac(6')-Ie/aph(2'')* в возникновении резистентности представляется ключевой. Детекция данного гена у изолятов *S. aureus* может быть рекомендована в качестве клинического скринингового теста на этапе выбора антибактериального препарата для

использования в составе костного цемента при изготовлении спейсера. В перспективе для быстрой идентификации генов резистентности к аминогликозидам у штаммов *S. aureus* требуется разработка мультиплексных ПЦР с дальнейшей стандартизацией метода и возможностью внедрения в лаборатории.

### Список литературы

1. Винклер Т., Трапуш А., Ренц Н., Перка К., Божкова С.А. Классификация и алгоритм диагностики и лечения перипротезной инфекции тазобедренного сустава // Травматология и ортопедия России. 2016. № 1 (79). С. 33-45.
2. Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани // Клин. Микробиол. и антимикроб. химиотер. 2012. № 14 (2). С. 118- 131.
3. Martínez-Moreno J., Merino V., Nácher A., Rodrigo J.L., Climente M., Merino-Sanjuán M. Antibiotic-loaded Bone Cement as Prophylaxis in Total Joint Replacement. *Orthop Surg.* 2017. vol. 9. no. 4. P. 331-341.
4. Osmon D.R., Berbari E.F., Berendt A.R., Lew D., Zimmerli W., Steckelberg J.M., Rao N., Hanssen A., Wilson W.R. Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 2013. vol. 56. no. 1. P. 1-25.
5. Triantafyllopoulos G., Memtsoudis S., Zhang W., Ma Y., Sculco T., Poultsides L. Periprosthetic Infection Recurrence After 2-Stage Exchange Arthroplasty: Failure or Fate? *The Journal of Arthroplasty.* 2017. vol. 32. no. 2. P. 526-531.
6. Ramirez M., Tolmasky M. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates.* 2010. vol. 13. P. 151-171.
7. Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам // АСТА Nature (русскоязычная версия). 2018. Т. 10. № 4 (39). С. 33-48.
8. Corona P., Espinal L., Rodríguez-Pardo D., Pigrau C., Larrosa N., Flores X. Antibiotic Susceptibility in Gram-Positive Chronic Joint Arthroplasty Infections: Increased Aminoglycoside Resistance Rate in Patients With Prior Aminoglycoside-Impregnated Cement Spacer Use. *The Journal of Arthroplasty.* 2014. vol. 29. P. 1617-1621.
9. Pulido M., Garcia-Quintanilla M., Martin-Pena R, Cisneros J., McConnell M. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013. vol. 68. P. 2710-2717.



10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. [Электронный ресурс] URL: <http://www.eucast.org> (дата обращения: 25.12.2020).
11. Campoccia D., Montanaro L., Pirini V., Ravaoli S., Arciola C. Prevalence of genes for aminoglycoside-modifying enzymes in *Staphylococcus epidermidis* isolates from orthopedic postsurgical and implant-related infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009. vol. 88. P. 654-663.
12. Fatholahzadeh B., Emaneini M., Feizabadi M.M., Sedaghat H., Aligholi M., Taherikalani M., Jabalameli F. Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009. vol. 33. no. 3. P. 264-265.
13. Sati G.C., Sarpe V.A., Furukawa T., Mondal S., Mantovani M., Hobbie S.N., Vasella A., Böttger E.C., Crich D. Modification at the 2'-Position of the 4,5-Series of 2-Deoxystreptamine Aminoglycoside Antibiotics To Resist Aminoglycoside Modifying Enzymes and Increase Ribosomal Target Selectivity. *ACS Infectious Diseases*. 2019. vol. 5 no. 10. P. 1718-1730.