

ДВУХЛЕТНЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕМЕНТНОГО СПЕЙСЕРА С ВАНКОМИЦИНОМ *IN VITRO*

Н.А. Ковтун^{1*}, А.В. Миронов¹, И.А. Редько¹, Ю.Ю. Титарова¹, М.Б. Базарова², В.В. Бояринцев²

¹ ФГБУ «Клиническая больница № 1» Управления делами Президента РФ, Москва

² ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента РФ, Москва

A TWO-YEAR TRIAL ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CEMENT SPACERS WITH VANCOMYCIN *IN VITRO*

N.A. Kovtun^{1*}, A.V. Mironov¹, I.A. Redko¹, Yu.Yu. Titarova¹, M.B. Bazarova², V.V. Boyarintsev²

¹ Clinical Hospital No 1 of Department of President Affairs, Moscow, Russia

² Central State Medical Academy of Department of President Affairs, Moscow, Russia

* E-mail: kovtun.na@mail.ru

Аннотация

Лечение периимплантной инфекции, вызванной *Staphylococcus aureus*, с применением цементных спейсеров, импрегнированных антибиотиком, отражено в отечественной и зарубежной литературе. Выполнено двухлетнее экспериментальное исследование антимикробной активности цементного спейсера с ванкомицином *in vitro*. По результатам проведенного исследования выявлено, что ванкомицин сохраняет бактерицидную активность в цементном спейсере длительный период времени.

Ключевые слова: цементный спейсер с ванкомицином, антимикробная активность.

Abstract

The management of peri-implant infection caused by *Staphylococcus aureus* with cement spacers impregnated with an antibiotic preparation is reflected in the domestic and foreign literature. A two-year experimental trial on the antimicrobial activity of cement spacers with Vancomycin *in vitro* was performed. It has been revealed that Vancomycin retains its bactericidal activity in a cement spacer for a long time.

Keywords: cement spacer, Vancomycin, antimicrobial activity.

Ссылка для цитирования: Ковтун Н.А., Миронов А.В., Редько И.А., Титарова Ю.Ю., Базарова М.Б., Бояринцев В.В. Двухлетнее исследование антимикробной активности цементного спейсера с ванкомицином *in vitro*. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2023; 4: 49–51.

Введение

Концепция использования цементных спейсеров предложена в 1970-х гг. Н. Wahlig и Н.В. Buchholz использовали гентамицин для предотвращения глубокой инфекции в области хирургического вмешательства после имплантации протеза тазобедренного сустава [1]. Микроорганизмы, размножающиеся на имплантатах, устойчивы к антибактериальной терапии. При этом с целью эрадикации микроорганизмов в составе биопленки требуются в 100 раз более высокие концентрации антибактериальных препаратов для достижения терапевтического эффекта [2]. Представители рода *Staphylococcus* являются одними из основных возбудителей перипротезной инфекции и обладают широким набором факторов патогенности и персистенции. *Staphylococcus aureus* способен к внутриклеточному существованию во многих клетках костной ткани, включая остеобласты, остеокласты и остеоциты, а при системной инфекции – в клетках Купфера, макрофагах [3, 4]. Наиболее сложными для лечения являются инфекции, вызванные метициллинрезистентными штаммами *S. aureus* (MRSA). Существующие в настоящее время антибактериальные препараты обеспечивают альтернативные методы лечения патогенов с множественной лекарственной устойчивостью, однако ванкомицин является антибиотиком первого выбора при MRSA-инфекции [5, 6].

Разрабатываются новые подходы к доставке антибиотиков к месту назначения для элиминации биопленок микроорганизмов. Высокие концентрации антибиотиков достигаются преимущественно путем местного введения. Применением устройств из цемента, импрегнированного антибиотиком, подтверждена возможность достичь значительно более высоких локальных концентраций антибактериальных препаратов [2, 7]. Ванкомицин удовлетворяет критерию ингибирования роста чувствительных микроорганизмов при местном использовании, обладает бактерицидным действием в отношении *S. aureus*, а потому наиболее применяем [8, 9]. Для ванкомицина характерно быстрое проникновение через гликокаликс, после внедрения в биопленку антибиотик демонстрирует внутри нее дозозависимую бактерицидную активность, особенно при наличии MRSA [7]. Кроме того, ванкомицин оказывает минимальный цитотоксический эффект и не вызывает системных побочных эффектов после локального введения. Недостатком данного препарата является слабое проникновение в окружающие ткани при внутривенном введении. При использовании спейсера, импрегнированного антибиотиком, положительным моментом является высвобождение антибактериального препарата в течение длительного периода времени [10].

Задачей экспериментального исследования было оценить длительность антимикробной активности цементного спейсера, импрегнированного ванкомицином, *in vitro*.

Материалы и методы

В экспериментальном исследовании использовали цементный спейсер, импрегнированный антибиотиком ванкомицином, эффективным в отношении *S. aureus in vitro*. Для изготовления спейсера использовали общепринятую методику импрегнирования антибиотика: в асептических условиях смешивали 40 г порошкообразного цементного полимера с 4 г ванкомицина, после чего в полученную сухую смесь добавляли жидкий мономер метилметакрилат, вследствие чего происходила экзотермическая реакция полимеризации, приводящая к затвердеванию в течение 10 минут [11, 12]. Оценку антимикробной активности проводили в отношении штаммов *S. aureus* из собственного музея штаммов микроорганизмов. Культуры штаммов приводили к стандартной мутности 0,5 по МакФарланду и использовали для получения бактериального газона на поверхности плотной питательной среды (агар Мюллера – Хинтон, HiMedia, модифицированный, для определения чувствительности к антимикотикам, по стандарту Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI)). Спейсер хранился при комнатной температуре в нестерильной емкости.

Спейсер и диски индикаторные картонные с противомикробным лекарственным средством – ванкомицин 30 мкг (НИЦФ, г. Санкт-Петербург) инкубировали при 37 °С на газоне бактериальной культуры *S. aureus* в течение 18–24 часов и оценивали антибиотикочувствительность диско-диффузионным методом в соответствии с методическими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2021-01).

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Поскольку для спейсеров нет утвержденных методов определения антимикробной активности, в экспериментальном исследовании использован метод диффузии в агар. Метод диффузии в агар – фармакопейный биологический метод определения активности антибиотиков – основан на способности молекул субстанций антибиотиков диффундировать в агар и образовывать зоны подавления роста, в которых не развиваются используемые тест-микроорганизмы, чувствительные к испытываемому антибиотику. При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых устанавливают в соответствии с международными биологическими стандартами. Оптимальными размерами зон подавления роста тест-микроорганизмов принято считать диаметры зон не менее 14 мм для минимальной концентрации и не более 25 мм – для максимальной.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты экспериментального исследования оценки эффективности антибактериального действия цементного спейсера с ванкомицином представлены в табл. 1.

Использование в качестве контроля диска с ванкомицином 30 мкг позволило подтвердить чувствительность музейного штамма *S. aureus*. На всем протяжении экспериментального исследования размер зоны подавления роста микроорганизма вокруг диска с ванкомицином 30 мкг составлял 18–20 мм. Интерпретацию значений диаметров зон подавления роста микроорганизма к ванкомицину оценивали как чувствительную при диаметре зоны ≥ 16 мм и устойчивую при диаметре зоны ≤ 15 мм.

Таблица 1

Оценка зоны ингибирования роста бактериальной культуры *Staphylococcus aureus*

| Период наблюдения, дни | Размер зоны лизиса вокруг диска с ванкомицином 30 мкг, мм | Размер зоны лизиса вокруг спейсера с ванкомицином, мм |
|------------------------|---|---|
| 1 | 20 | 30 |
| 7 | 19 | 30 |
| 21 | 19 | 20 |
| 30 | 20 | 20 |
| 45 | 19 | 20 |
| 60 | 20 | 19 |
| 90 | 18 | 17 |
| 120 | 20 | 18 |
| 150 | 19 | 17 |
| 180 | 20 | 16 |
| 210 | 19 | 16 |
| 240 | 20 | 15 |
| 270 | 19 | 14 |
| 300 | 19 | 12 |
| 330 | 19 | 11 |
| 365 | 19 | 11 |
| 520 | 20 | 10 |
| 640 | 20 | 3 |
| 700 | 20 | 0 |

Диаметр зон подавления роста микроорганизма измеряли с определенным интервалом времени, данные представлены в табл. 1. Размер зоны подавления роста микроорганизма вокруг спейсера с ванкомицином в первый месяц достигал 30 мм, а вокруг диска с антибиотиком – 20 мм. На протяжении первого года измерение зоны подавления роста микроорганизма было ежемесячным. Как видно из полученных данных, бактерицидные свойства спейсера с ванкомицином проявлялись в течение девяти месяцев. При последующем измерении через 1–1,5 года наблюдалась умеренная резистентность штаммов, а через два года наблюдалась устойчивость *S. aureus*. Результаты исследования подтверждают, что эффективная концентрация ванкомицина сохраняется в спейсерах длительный период времени. Антимикробная активность цементного спейсера с ванкомицином в отношении *S. aureus* снизилась спустя девять месяцев.

На рис. 1 наглядно продемонстрировано, как проводилось измерение диаметра зон подавления роста культуры *S. aureus* на протяжении экспериментального исследования.

На представленном образце от 10 марта 2020 г. спустя 270 дней зона подавления роста микроорганизма вокруг диска с ванкомицином составила 19 мм, а диаметр зоны лизиса вокруг спейсера – 14 мм. Таким образом, цементный спейсер, импрегнированный ванкомицином, продемонстрировал эффективный антибактериальный эффект с высоким начальным темпом высвобождения препарата и постепенным его снижением. Данные других исследований *in vitro* для разных антибактериальных препаратов в составе костного цемента также показывают снижение с течением времени антибактериальной активности [13].

Исследование показало, что антимикробная активность цементного спейсера, импрегнированного ванкомицином, в отношении *S. aureus* сохранялась на протяжении девяти месяцев. Сложно соотнести результаты исследований *in vitro* с результатами *in vivo*, но, согласно литературным данным, при имплантации спейсера, импрегнированного антибиотиком,

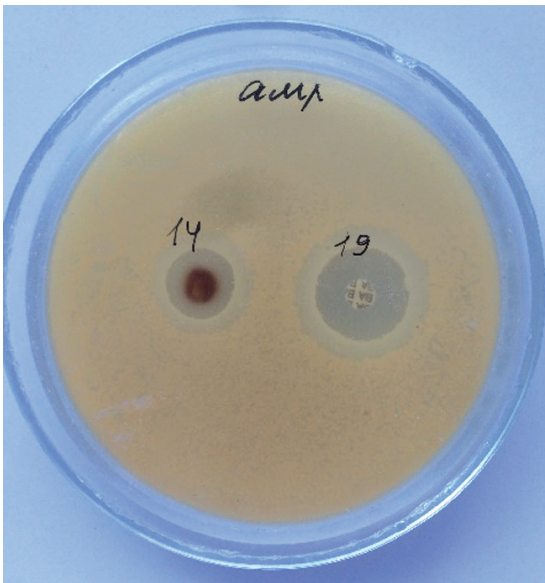


Рис. 1. Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом

наблюдается низкая частота местных и системных побочных реакций, время выздоровления и клинический исход удовлетворительны [11, 12, 14]. Цементные спейсеры с антибиотиками можно рассматривать как важное дополнение к стандартным схемам терапии при ревизии инфицированных протезов. Выбор антибиотика, способ доставки, дозировка и продолжительность антибактериальной терапии являются аспектами, которые еще предстоит рассмотреть в будущих исследованиях.

Заключение

Эффективность локального использования цементного спейсера для лечения инфекции в ортопедии является общепризнанной, и его применение рассматривается в качестве дополнения к основной терапии. Цементный спейсер, изготовленный индивидуально для определенного пациента, имеет преимущества, так как антибактериальный препарат подбирается с учетом чувствительности выявленного микроорганизма. Для полной элиминации микроорганизма требуется значительное увеличение концентрации антибактериальных препаратов в очаге воспаления. Эффективным решением этой задачи может быть использование спейсера в качестве депо антибиотиков, из которого осуществляется их постепенное выделение в окружающие ткани.

Литература

1. Wahlig H. et al. Experimental and clinical studies on the release of gentamicin from bone cement // *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin.* – 1972. – V. 43. – No. 10. – P. 441–445.
2. Namdari S. et al. Antibiotic spacers for shoulder periprosthetic joint infection: a review // *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* – 2022. – V. 30. – No. 19. – P. 917–924. DOI: 10.5435/JAAOS-D-21-00984.
3. Keller D.M. et al. Use of antibiotic-cement coated locking plates in the setting of periprosthetic infection and infected nonunion // *Injury.* – 2022. – V. 53. – No. 7. – P. 2567–2572. DOI: 10.1016/j.injury.2022.03.040.
4. Arciola C.R. et al. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion // *Nature reviews*

5. Crabbé A. et al. Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms // *Trends in microbiology.* – 2019. – V. 27. – No. 10. – P. 850–863. DOI: 10.1016/j.tim.2019.05.003.
6. Божкова С.А. и др. Неблагоприятные тенденции в этиологии ортопедической инфекции: результаты 6-летнего мониторинга структуры и резистентности ведущих возбудителей // *Травматология и ортопедия России.* – 2018. – Т. 24. – № 4. – С. 20–31. [Bozhkova S.A. et al. Adverse trends in the etiology of orthopedic infection: results of 6-year monitoring of the structure and resistance of leading pathogens // *Traumatology and Orthopedics of Russia.* – 2018. – V. 24. – No. 4. – P. 20–31. In Russian]. DOI: 10.21823/2311-2905-2018-24-4-20-31.
7. Ajit Singh V. et al. Hand-mixed vancomycin versus commercial tobramycin cement revisited: a study on mechanical and antibacterial properties // *Journal of Orthopaedic Surgery.* – 2019. – V. 27. – No. 2. DOI: 10.1177/2309499019839616.
8. Lamret F. et al. Antibiotic tolerance of *Staphylococcus aureus* biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies // *Antibiotics.* – 2020. – V. 9. – No. 9. – P. 547. DOI: 10.3390/antibiotics9090547.
9. Boswihi S.S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update on the epidemiology, treatment options and infection control // *Current Medicine Research and Practice.* – 2018. – V. 8. – No. 1. – P. 18–24. DOI:10.1016/j.cmrp.2018.01.001.
10. Wong M. et al. Experience with high dose once-daily vancomycin for patients with skin and soft-tissue infections in an ambulatory setting // *Open Forum Infectious Diseases.* – Oxford University Press, 2017. – V. 4. – No. 1. – P. S338. DOI: 10.1093/ofid/ofx163.805.
11. Линник С.А. и др. Спейсер тазобедренного сустава. – 2019. [Linnik S.A. et al. Spacer of the hip joint. – 2019. In Russian].
12. Линник С.А. и др. Выбор спейсера на первом этапе лечения поздней глубокой перипротезной инфекции тазобедренного сустава // *Гений ортопедии.* – 2021. – Т. 27. – № 5. – С. 548–554. [Linnik S.A. et al. Choice of spacer at the first stage of treatment of late deep periprosthetic infection of the hip joint // *Genius of Orthopedics.* – 2021. – V. 27. – No. 5. – P. 548–554. In Russian]. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-5-548-554.
13. Кимайкина О.В. и др. Оценка антимикробной активности антибиотиков в костном цементе для спейсеров // *Проблемы медицинской микологии.* – 2018. – Т. 20. – № 2. – С. 76–77. [Kimaykina O.V. et al. Assessment of the antimicrobial activity of antibiotics in bone cement for spacers // *Problems of medical mycology.* – 2018. – V. 20. – No. 2. – P. 76–77. In Russian].
14. Афиногенова А.Г. и др. Микробиологическое обоснование создания композиции на основе костного цемента с пролонгированным антимикробным действием в отношении гентамицин-устойчивых *Staphylococcus epidermidis* // *Проблемы медицинской микологии.* – 2018. – Т. 20. – № 4. – С. 49–54. [Afinogenova A.G. et al. Microbiological evaluation of the compositions based on bone cement with prolonged antimicrobial action against gentamicin-resistant *staphylococcus epidermidis* // *Problems in medical mycology.* – 2018. – V. 20. – No. 4. – P. 49–54. In Russian].