

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ «МОНОАЗИДОМ ПРОПИДИЯ – ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ СУСТАВОВ**

*Лямцева А. К., Костюк С. А., Полуян О. С.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Моноазид пропидия представляет собой интеркалирующий ДНК краситель, который обладает способностью проникать только в нежизнеспособные бактериальные клетки с поврежденными мембранами и используется в сочетании с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в реальном времени для дифференциации жизнеспособных и нежизнеспособных бактериальных клеток. В данном исследовании 25 образцов из полости эндопротезированных суставов, взятых у

пациентов с признаками перипротезной инфекции, обрабатывали моноазидом пропидия или оставляли необработанными перед экстракцией ДНК для дальнейшей детекции *Staphylococcus aureus* методом ПЦР в реальном времени. Результаты исследования показали, что моноазид пропидия ингибирует обнаружение нежизнеспособных бактериальных клеток. Разработанная авторская методика «Моноазидом пропидия–полимеразная цепная реакция в режиме реального времени» может ограничить ложноположительные результаты при проведении молекулярной диагностики для установления этиологической структуры перипротезной инфекции, что требует дальнейшей апробации на клинических образцах.

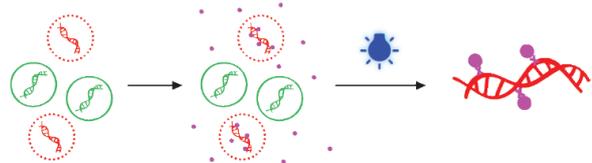
**Ключевые слова:** моноазид пропидия, РМА, ПЦР, перипротезная инфекция, эндопротезирование, *Staphylococcus aureus*.

**Введение.** Эндопротезирование тазобедренного и коленного суставов является одним из самых эффективных хирургических вмешательств в современной ортопедии, позволяющим значительно улучшить качество жизни пациентов с заболеваниями суставов различной этиологии. В связи с этим количество выполняемых эндопротезирований как в мире, так и в Республике Беларусь ежегодно увеличивается. Соответственно, растет и количество осложнений, требующих ревизионных вмешательств. Перипротезная инфекция (ППИ) является серьезным осложнением после эндопротезирования, а ее лечение связано с высокими затратами и сопровождается значительным влиянием на физическое и психоэмоциональное состояние пациента [1].

Успешное ведение пациентов с ППИ зависит от ранней и точной диагностики. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) представляет собой быструю и простую процедуру обнаружения и количественного определения патогенных бактерий [2]. Тем не менее, ПЦР не различает жизнеспособные и нежизнеспособные бактериальные клетки из-за персистенции ДНК даже после потери жизнеспособности клеток.

Интеркалирующий ДНК краситель, моноазид пропидия (МАП, англ. РМА –Propidium Monoazide), можно использовать в сочетании с ПЦР в режиме реального времени, чтобы преодолеть это ограничение. Попав внутрь клетки с поврежденной мембраной МАП, связывается с бактериальной ДНК после фотоактивации и ингибирует ее амплификацию во время ПЦР. На рисунке 1 показан принцип модификации МАП: непроницаемый для клеточной мембраны краситель МАП (фиолетовые точки) избирательно проникает в нежизнеспособные клетки с поврежденными мембранами (красные) и после воздействия светом ковалентно модифицирует ДНК. Последующая ПЦР-амплификация матриц ДНК, модифицированных МАП, ингибируется, что позволяет селективный количественный анализ ДНК из жизнеспособных клеток (зеленый) [3].

Преимущество обработки МАП перед ПЦР заключается в возможности избирательного обнаружения и количественного определения жизнеспособных форм микроорганизмов. Кроме того, способность метода отличать жизнеспособные бактерии от нежизнеспособных может помочь более точно оценить различные протоколы лечения с использованием противомикробных препаратов или без них [4].



**Рисунок 1 – Принцип модификации МАП**

Данная методика применялась в области стоматологии для оптимизации микробиологического анализа клинических образцов до и после пародонтологического лечения. Авторы обнаружили, что при предварительной обработке образцов МАП обнаруженная микробная нагрузка была последовательно меньше, поскольку были обнаружены только жизнеспособные бактерии, тогда как при использовании только метода ПЦР в режиме реального времени были обнаружены все бактерии как жизнеспособные, так и нежизнеспособные, присутствующие в образцах зубного налета [5].

Для успешного применения МАП перед ПЦР необходима оптимизация экспериментальных условий, поскольку на результаты могут влиять многие факторы, в том числе концентрация красителя и эндогенные характеристики микроорганизмов.

**Цель работы** – разработать методику «Моноазидом пропидия – полимеразная цепная реакция» для обнаружения ДНК *Staphylococcus aureus* и апробировать на биологическом материале пациентов с перипротезной инфекцией после

эндопротезирования крупных суставов (коленный и тазобедренный).

**Материалы и методы.** Исследование проводилось на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (НИИЭиКМ БГМУ).

Были исследованы 25 образцов из полости коленного или тазобедренного сустава, взятых у пациентов, которым было проведено первичное эндопротезирование тазобедренного/коленного сустава в учреждении здравоохранения «Минская областная клиническая больница» за период с 2022 по 2024 гг. Возраст пациентов (медиана (Me) и размах (min...max)), включенных в исследование на момент обследования составил 54 (41...62) года. В обследуемой группе пациентов удельный вес мужчин составил  $56,00 \pm 6,94\%$  (n=14), женщин –  $44,00 \pm 6,26\%$  (n=11). У пациентов ППИ коленного сустава n=10 случаев, ППИ тазобедренного – n=15 случаев.

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие синовиальной жидкости и фрагментов синовиальной оболочки. Забор биологического материала осуществлялся врачами-ортопедами по разработанной ими методике артроскопической синовиальной биопсии, трепан-биопсии коленного/тазобедренного сустава из минимально-инвазивных доступов под контролем электронно-оптического преобразователя (ЭОП) навигации. Синовиальную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, фрагменты синовиальной оболочки в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробирки с биологическим материалом отправляли в НИИЭиКМ БГМУ, где их замораживали и оставляли для хранения при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего исследования. Обработку биологических образцов из полости эндопротезированных суставов проводили по специальной разработанной схеме (рисунок 2). В качестве положительного контроля был использован референс-штамм *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 6538. Для проведения молекулярно-биологических исследований забирали материал с поверхности плотной питательной среды, используя одноразовые зонды. Полученный материал помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Оптимизация концентрации МАП.** Для оптимизации концентрации МАП (Biotium, США; исходная концентрация 20 мМ в 100 мкл воды) были протестированы четыре различные концентрации на референс-штамме S. aureus ATCC 6538: 10, 20, 50 и 100 мкМ. Образцы были разделены на две группы: группа 1 – микроорганизмы с подтвержденной и сохраненной жизнеспособностью, группа 2 – микроорганизмы, аттенуированные, утратившие жизнеспособность, путем нагревания в термо-шейкере (Biosan, Латвия) при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. После добавляли МАП в пробирки и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая, тем самым позволяя МАП проникнуть в нежизнеспособные клетки и интеркалировать с ДНК. Затем образцы подвергали воздействию света с помощью 600 Вт галогенной лампы в течение 10 минут. Во время фотоактивации образцы помещали на лед на расстоянии 20 см от источника света и укладывали горизонтально, чтобы избежать чрезмерного нагрева. Образцы встряхивали каждые 30 с для обеспечения однородности светового воздействия. Перед экстракцией ДНК образцы осаждали при 12 000 об/мин в течение 5 минут и дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS).



**Рисунок 2 – Схема обработки образцов биологического материала из полости эндопротезированных суставов**

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для амплификации гена 16S *S. aureus* использовали: *S. aureus*-forward – 5'-GCGTGCCTAATACATGCAAGTC-3', *S. aureus*-reverse – 5'-CCGCCGCTAACATCAGAGAAG-3'; *S. aureus*-probe – 5'-FAM-ACGGACGAG-AAGCTTG-BHQ1-3' [6]. Амплификацию ДНК проводили с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ «2Х премикс для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь) на приборе Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). В состав амплификационной смеси при использовании праймеров *S. aureus* были включены: 15,0 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ»; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда; 4,2 мкл воды и 5 мкл ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 95 °С – 10 минут; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 15 с.

Для каждой из жизнеспособной и нежизнеспособной бактериальной суспензии рассчитывали разницу в пороге цикла  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ), где  $\Delta C_t$  жизнеспособных – разность между значением  $C_t$  жизнеспособных бактерий при обработке МАП и без нее, а  $\Delta C_t$  нежизнеспособных – разность между значением  $C_t$  нежизнеспособных бактерий при обработке МАП и без нее. Оптимальные условия обработки МАП должны иметь самый высокий  $\Delta C_t$  нежизнеспособных и самый низкий  $\Delta C_t$  жизнеспособных.

*Апробация МАП на образцах биологического материала из полости исследуемых суставов.* Образцы биологического материала из полости исследуемых суставов были разделены на две группы: группа 1 – обрабатывали МАП, группа 2 – оставляли необработанной.

Перед выделением ДНК образцы синовиальной жидкости предварительно центрифугировали при 2500g в течение 10 минут, в полученный осадок добавляли 100 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь) и использовали для дальнейших исследований. Перед выделением ДНК из фрагментов синовиальной оболочки образцы гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) в течение 3 минут с частотой 10/с. В пробирки с биологическим материалом группы 1 добавляли МАП, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 5 минут, периодически перемешивая. Затем образцы подвергали воздействию света с помощью 600 Вт галогенной лампы в течение 10 минут. Во время фотоактивации образцы помещали на лед на расстоянии 20 см от источника света и укладывали

горизонтально, встряхивали каждые 30 с. Перед экстракцией ДНК образцы осаждали при 12 000 об/мин в течение 5 минут и дважды промывали PBS.

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «АртСпин» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Определение концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрически (NanoDrop 1000, Thermo scientific) при длинах волн 280 и 260 нм. Для чистого препарата ДНК с отсутствием примесей белка и других ингибиторов значение  $A_{260/280}$  составляет 1,8.

Для амплификации гена 16S *S. aureus* использовали: *S. aureus*-forward – 5'-GCGTGCCTAATACATGCAAGTC-3', *S. aureus*-reverse – 5'-CCGCCGCTAACATCAGAGAAG-3'; *S. aureus*-probe – 5'-FAM-ACGGACGAGAAGCTTG-BHQ1-3' [6]. Амплификацию ДНК проводили с использованием готовой смеси для ПЦР-РВ «2Х премикс для ПЦР-РВ» («Праймтех», Республика Беларусь) на приборе Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). В состав амплификационной смеси при использовании праймеров *S. aureus* были включены: 15,0 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ»; 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда; 4,2 мкл воды и 5 мкл ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 95 °С – 10 минут; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 15 с.

Амплификацию гена  $\beta$ -глобина человека использовали для подтверждения факта выделения исключительно микробной ДНК. В состав реакционной смеси были включены:  $\beta$ Glo-forward – 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3',  $\beta$ Glo-reverse – 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGT-AC-3'. Состав смеси: 12,5 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ» (Праймтех, Республика Беларусь); 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного); 1,0 мкл интеркалирующего красителя ZUBR Green-1; 7,5 мкл воды и 3 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации: 1 цикл: 94 °С – 5 минут; 35 циклов: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; 1 цикл: 72 °С – 10 минут (Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Австралия).

Положительный образец ПЦР определялся как эффективная избирательная амплификация с использованием кривой диссоциации со значением  $C_t$  выше порога обнаружения.

Определение положительного результата ПЦР в режиме реального времени – это результат с двумя или более положительными образцами фрагментов синовиальной оболочки и/или

положительной синовиальной жидкости в одном и том же анализе.

Для сопоставления эффективности различных методов диагностики использовали общепринятые подходы, представляющие собой различные варианты приложения теоремы Байеса. При этом рассчитывали: диагностическую чувствительность метода = истинно положительный (ИП) результат / ИП результат + ложно отрицательный (ЛО) результат  $\times 100\%$ ; диагностическую специфичность метода = истинно отрицательный (ИО) результат / ИО результат + ложно положительный (ЛП) результат  $\times 100\%$ ; прогностическое значение положительного результата = ИП / ИП + ЛП  $\times 100\%$  и прогностическое значение отрицательного результата = ИО / ИО + ЛО  $\times 100\%$ .

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Для тестирования данных на подчинение закону нормального распределения использовались показатели асимметрии и эксцесса, W-критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова, а также осуществлялось построение графиков распределения. Данные не подчинялись закону нормального распределения, что позволило применить для статистической обработки непараметрические методы. Парные сравнения независимых выборок по количественным характеристикам проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Для представления полученных данных использовали показатели медианы (Me) и процентилей (Q<sub>25</sub>/Q<sub>75</sub>). Анализ категориальных признаков проводили с помощью критерия  $\chi^2$ -Пирсона ( $\chi^2$ ) в таблице сопряженности  $2 \times 2$ . Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Для построения графика использовался GraphPad Prism 8. Для описания частот выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения.

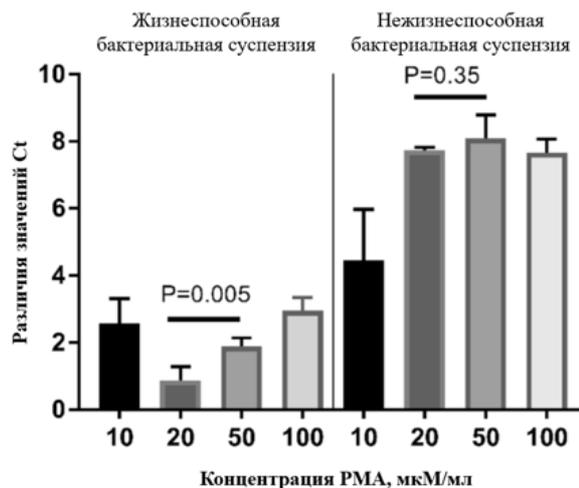
**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе исследования нами были оптимизированы концентрации МАП на референс-штамме *S. aureus* ATCC 6538.

Значения  $\Delta Ct$  жизнеспособной бактериальной суспензии увеличивались с увеличением концентрации МАП от 20 до 100 мкМ. Значения  $\Delta Ct$  нежизнеспособной бактериальной суспензии увеличивались с увеличением концентрации МАП от 10 до 50 мкМ.

Разница в значениях  $\Delta Ct$  нежизнеспособной бактериальной суспензии между концентрацией 20 и 50 мкМ была статистически не

значимой (p=0,35). Однако  $\Delta Ct$  жизнеспособной бактериальной суспензии имела статистически значимые различия между данными концентрациями (p=0,005).

Таким образом, была выбрана концентрация МАП – 20 мкМ, так как это самая низкая концентрация, обеспечивающая хорошую дискриминацию жизнеспособных и нежизнеспособных бактериальных клеток (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Оптимизация концентраций МАП на референс-штамме *S. aureus* ATCC 6538**

Полученные результаты по определению концентрации и степени чистоты выделенной ДНК из образцов биологического материала исследуемых суставов с использованием набора реагентов «АртСпин» с предварительной обработкой образцов МАП (группа 1) и стандартной методикой без обработки МАП (группа 2) при длинах волн 280 и 260 нм представлены в таблице.

**Таблица 1 – Значения  $A_{260/280}$ , полученные после экстракции ДНК, (Me (Q<sub>25</sub>/Q<sub>75</sub>))**

Методика обработки ДНК	$A_{260/280}$
Группа 1	1,76 (1,69/1,91)
Группа 2	1,72 (1,65/1,85)

Таким образом, отношение  $A_{260/280}$  для группы 1 и группы 2, близкое к 1,8 и указывает на то, что препараты ДНК, выделенные данными методиками, можно рассматривать как свободные от примесей белка. Достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было (p>0,05).

При проведении ПЦР в режиме реального времени с предварительной обработкой моноазидом пропидия зарегистрировано отсутствие пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией при оценке гена  $\beta$ -глобина, что свидетельствовало об отсутствии ДНК клеток человека в исследуемом биологическом материале.

Частота выявления *S. aureus* в группе 1 (с предварительной обработкой МАП) составила 52 % (n=13) случаев, в группе 2 (без предварительной обработки МАП) – 60 % (n=15) случаев. В ходе анализа результатов достоверных отличий ( $\chi^2=0,33$ ,  $p=0,57$ ) по частоте выявления *S. aureus* между группами исследования установлено не было.

Диагностическая чувствительность разработанной авторской методики с предварительной обработкой образцов МАП с последующей ПЦР в режиме реального времени составила 86,67 %, диагностическая специфичность – 100 %, прогностическая ценность положительного и отрицательного результата составила 100 и 83,33 % соответственно, что демонстрирует высокую диагностическую эффективность.

По литературным данным, *S. aureus* является важным патогеном в силу своей вирулентности и частоты встречаемости. В научной публикации Wisplinghoff H. и соавт. [7] указано, что основная причина ППИ – *S. aureus*, который также является одной из частых причин серьезных инвазивных инфекций, включая нозокомиальные и внутрибольничные инфекции кровотока, что впоследствии могут привести к ППИ. Получение гемодиализа, ревматоидный артрит, диабет и колонизация носа *S. aureus* связаны с повышенным риском инвазивной инфекции, соответственно, пациенты с ППИ, вызванным *S. aureus*, часто

имеют множественные сопутствующие заболевания. Первичная симптоматика у данной группы пациентов определяется острой инфекцией, однако сообщается о симптомах, сохраняющихся до нескольких лет, что, вероятно, является следствием предыдущих попыток лечения, что позволяет утверждать, что *S. aureus* – вариабельный микроорганизм, склонный к образованию биопленок, поэтому может вызывать более вялотекущую форму после предыдущих попыток лечения.

**Заключение.** Классический метод ПЦР в режиме реального времени, основанный на выявлении ДНК искомого возбудителя, не позволяет исследователям убедиться в жизнеспособности выявляемого микроорганизма, поскольку ДНК – это долгоживущая макромолекула биологической клетки. При установлении этиологии перипротезной инфекции для выбора тактики ведения пациента врачу важно иметь убедительную информацию о присутствии или отсутствии жизнеспособных форм микроорганизмов в полости инфицированного сустава после эндопротезирования.

Данное исследование показывает возможность преодоления неизбежного обнаружения бактериальной ДНК в ПЦР в режиме реального времени путем предварительной обработки образцов моноазидом пропидия и различать жизнеспособные и нежизнеспособные бактериальные клетки.

Таким образом, обработка моноазидом пропидия с последующей ПЦР в режиме реального времени может ингибировать амплификацию ДНК из нежизнеспособных клеток, не затрагивая ДНК из жизнеспособных клеток, тем самым предоставляя более точную информацию о наличии жизнеспособной бактериальной нагрузки.

#### Список цитированных источников

1. Перипротезная инфекция в ортопедии: легко ли установить данный диагноз? / А. Н. Бенько [и до.] // Медицинские новости. – 2023. – № 10. – С. 23–28.
2. Костюк, С. А. Молекулярно-биологические методы в медицине: монография / С. А. Костюк. – Минск : БелМАПО, 2013. – 327 с.
3. PMA (Propidium Monoazide). Product Information [Electronic resource]: Biotium. – Mode of access: <https://biotium.com>. – Date of access: 20.04.2024.
4. Modern approaches to differentiation of live and dead bacteria using selective amplification of nucleic acids / A. K. Baymiev [et al.] // Microbiology. – 2020. – Vol. 89. – P. 13–27.
5. Microbiological testing of clinical samples before and after periodontal treatment. A comparative methodological study between real-time PCR and real-time-PCR associated to propidium monoazide / M. Sereti [et al.] // Clin. Exp. Dent. Res. – 2021. – Vol. 7, N 6. – P. 1069–1079.
6. Rak, M. Comparison of molecular and culture method in diagnosis of prosthetic joint infection / M. Rak // FEMS Microbiol. Lett. – 2013. – Vol. 343, N 1. – P. 42–48.
7. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39. – P. 309–317.



## Development of the «propidium monoazide – real-time polymerase chain reaction» method for the detection *Staphylococcus aureus* in the etiologic diagnosis of periprosthetic joint infection

*Lyamtseva A. K., Kostiuk S. A., Poluyan O. S., Benko A. N.  
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Propidium monoazide is a DNA intercalating dye that has the ability to penetrate only non-viable bacterial cells with damaged membranes and is used in conjunction with real-time polymerase chain reaction (PCR) to differentiate between viable and non-viable bacterial cells. In this study, 25 samples from the cavity of endoprosthesis joints, from patients with signs of periprosthetic infection, were treated with propidium monoazide or left untreated before DNA extraction for further detection of *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. The results showed that propidium monoazide inhibited the detection of non-viable bacterial cells. The developed author's method «Propidium monoazide – real-time polymerase chain reaction» can limit false-positive results in molecular diagnostics to establish the etiologic structure of periprosthetic infections, which requires further validation on clinical samples.

**Keywords:** propidium monoazide, PMA, PCR, periprosthetic joint infection, endoprosthesis replacement, *Staphylococcus aureus*.