

A.K. Лямцева

**ПЦР И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА 16S рРНК В ДИАГНОСТИКЕ
ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ СУСТАВОВ**

Научный руководитель: д-р мед. наук, проф. С.А. Костюк

*Научно-исследовательская лаборатория научно-исследовательского института
экспериментальной и клинической медицины
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

A.K. Lyamtseva

**16S rRNA GENE PCR AND SEQUENCING IN DIAGNOSTICS OF PROSTHETIC
JOINT INFECTION**

Tutor: professor S.A. Kostyuk

*Research Laboratory of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine
Belarusian State Medical University, Minsk*

Резюме. ПЦР анализ в сочетании с секвенированием позволил установить участие условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus*, рода *Streptococcus*, а также родов *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia* в формировании перипротезной инфекции после эндопротезирования крупных суставов.

Ключевые слова: ПЦР, ген 16S рРНК, секвенирование, условно-патогенные микроорганизмы, перипротезная инфекция суставов, эндопротезирование суставов.

Resume. PCR analysis in combination with sequencing allowed to establish the participation of opportunistic microorganisms of the genus *Staphylococcus*, genus *Streptococcus*, as well as genera *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia* in the formation of periprosthetic infection after endoprosthesis replacement of large joints.

Keywords: PCR, 16S rRNA gene, sequencing, opportunistic microorganisms, periprosthetic joint infection, endoprostheses replacement.

Актуальность. Перипротезная инфекция (ППИ) суставов является одной из самых серьезных осложнений в ортопедической хирургии. Отсутствие стандартного определения или общепринятых диагностических критериев представляет собой проблему ведения пациентов с ППИ. Даже традиционный бактериологический метод посева не может считаться золотым стандартом диагностики данной инфекции [1]. Учитывая широкий спектр потенциальных микроорганизмов, выступающих в роли этиологического фактора ППИ, окончательная идентификация микробного агента является необходимой для оптимизации хирургического подхода и начала соответствующей долгосрочной антибиотикотерапии [2].

ПЦР и секвенирование гена 16S рРНК представляет собой привлекательную альтернативу для обнаружения и идентификации бактериальных патогенов в клинических образцах пациентов, у которых имеется высокое подозрение на инфекцию, но бактериальные культуры отрицательны.

Цель: разработать и апробировать методику универсального ПЦР анализа для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов в сочетании с секвенированием для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции, обусловленной эндопротезированием коленного/тазобедренного сустава.

Материал и методы. В основную группу исследования были включены 32 пациента с наличием признаков ППИ, которым за период с 2022 по 2024 гг. в УЗ «Минская областная клиническая больница» было проведено первичное эндопротезирование тазобедренного/ коленного сустава. В контрольную группу были включены 10 пациентов после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава без признаков ППИ.

Возраст пациентов основной группы на момент обследования составил 57 (47/71) лет. В обследуемой группе пациентов удельный вес мужчин составил 62,5% (95% ДИ: 43,7-78,9%) (n=20), женщин – 37,5% (95% ДИ: 21,1-56,3%) (n=12). Возраст пациентов контрольной группы составил 51 (47/62) лет, удельный вес мужчин составил 60,0% (95% ДИ: 26,2-87,8%) (n=6), женщин – 40,0% (95% ДИ: 12,2-73,8%) (n=4).

Образцы синовиальной жидкости (n=42) и синовиальной ткани (n=42) у пациентов групп исследования были получены из полости исследуемых суставов с использованием разработанной врачами-травматологами-ортопедами методикой 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 эпендорф объемом 1,5 мл, синовиальную ткань в пробирку типа эпендорф объемом 1,5 мл содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», РБ).

Выделение ДНК из синовиальной жидкости проводили с использованием готового коммерческого набора «АртДНК Легкий» («АртБиоТех», РБ). Для выделения ДНК из синовиальной ткани применяли предварительную гомогенизацию в течение 3 минут (частота 10/с) с участием гомогенизатора «TissueLyser II» (Qiagen) с последующей экстракцией набором реагентов «АртСпин» («АртБиоТех», РБ), основанного на применении колонок с сорбирующей мембраной. Для определения степени чистоты полученной ДНК проводили спектрофотометрический анализ («NanoDrop 1000», «Thermo Fisher Scientific»), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A_{260/280}).

Амплификацию проводили с использованием универсальных прокариотических праймеров: fD1 (прямой, 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') и rP2 (обратный, 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), нацеленных на гипервариабельные области V1 и V3 в гене 16S рРНК. Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», РБ); 0,4 мкл прямого праймера, 0,4 мкл обратного праймера, 6,7 мкл воды и 5 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации включала следующие стадии: начальная денатурация при 95 °C – 2 мин; далее 30 циклов (денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг праймеров при 55 °C – 30 с, элонгация при 72 °C –

1 мин), финальная элонгация при 72 °C в течение 2 мин. Для проведения ПЦР применяли амплификатор «Rotor-Gene-3000» («Corbett research», Австралия).

Для контроля выделения ДНК и отсутствия ингибитора ПЦР ген β-глобина человека амплифицировали для каждого образца с праймерами βGloF (прямой, 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') и βGloR (обратный, 5'-GGAAAATAGACCAATAAGGCAG-3'). Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «2Х премикс для ПЦР-РВ» («Прайтех», РБ); 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 включала следующие стадии: начальная денатурация при 94 °C – 5 мин; далее 35 циклов (денатурация при 94 °C – 30 с, отжиг праймеров при 55 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 30 с), финальная элонгация при 72 °C в течение 10 мин. Для проведения ПЦР применяли амплификатор «Rotor-Gene-3000» («Corbett research», Австралия).

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 1% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (концентрация 0,3 мкг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Длину амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса «DNA Ladder 1 kb» («Евроген», РФ). Предполагаемые продукты амплификации для гена 16S рРНК имели размер примерно 1500 п.н. Амплифицированные образцы хранили при -20 °C.

В ходе подготовки ампликонов к постановке секвенирующей ПЦР использовали набор для ферментативной очистки «ExS-Pure» («Nimrogen», Нидерланды). Секвенирующую ПЦР проводили с применением набора «BrilliantDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Nimrogen», Нидерланды) согласно протоколу производителя. Очистку полученных ампликонов выполняли с использованием набора реагентов «iX-Pure DyeTerminator Cleanup Kit» («Nimrogen», Нидерланды).

Первые 500 п.н. гена 16S рРНК были секвенированы по прямой и обратной последовательностям праймеров на генетическом анализаторе ABI Prism 310 («Applied Biosystems», США). Просмотр и интерпретацию полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Sequencing Scanner Software 2 v.2.0 («Applied Biosystems», США). Полученные данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST в базе нуклеотидных последовательностей GenBank через сервер NCBI (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Для тестирования данных на подчинение закону нормального распределения использовались показатели ассиметрии 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 (M_e) и процентилей (Q_{25}/Q_{75}). Анализ категориальных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера в таблице сопряженности 2x2. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. Для оценки количества и качества выделенной ДНК из синовиальной жидкости ($n=42$) набором реагентов «АртДНК Легкий» и из синовиальной ткани ($n=42$) набором реагентов «АртСпин» проводили сравнение значений показателя $A_{260/280}$, а также значений пороговых циклов (C_t) при амплификации house-keeping гена β -глобина человека (таблица 1).

Табл. 1. Значения соотношения $A_{260/280}$ и пороговых циклов, полученные при выделении ДНК ($M_e (Q_{25}/Q_{75})$)

Показатель	«АртДНК Легкий»	«АртСпин»
$A_{260/280}$	1,77 (1,69/1,82)	1,79 (1,70/1,84)
Значение C_t	20,68 (18,81/24,20)	22,53 (20,47/25,19)

Таким образом, по показателям достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было ($p>0,05$). Значение показателя $A_{260/280}$ для ДНК, выделенной набором реагентов «АртДНК легкий» и «АртСпин» близкое к 1,8, что указывает на отсутствие примесей белка и других ингибиторов. Амплификация гена β -глобина человека наблюдалась во всех образцах биологического материала, что также говорит об отсутствии ингибиторов ПЦР. Полученные данные позволяют сделать вывод, что как ДНК, выделенную из синовиальной жидкости набором реагентов «АртДНК Легкий», так и ДНК, выделенную из синовиальной ткани набором реагентов «АртСпин», можно использовать для дальнейших исследований.\

Методом ПЦР была проведена амплификация гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров. На рисунке 1 представлен электрофоретический анализ полученных ампликонов из синовиальной ткани пациентов основной группы.

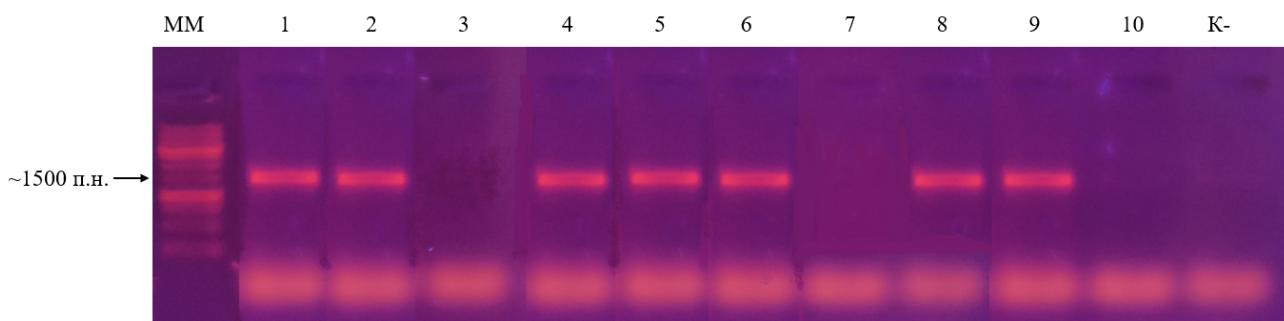


Рис. 1 – Визуализация амплифицированного гена 16S рРНК. ММ – маркер молекулярной массы ДНК; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 – положительные образцы; 3, 7, 10 – отрицательные образцы; К- – отрицательный контроль (вода)

При электрофоретическом анализе были зафиксированы чёткие полоски свечения на уровне, соответствующем массе специфического фрагмента в 16 (50,00%; ДИ: 31,89-68,11%) образцах синовиальной жидкости и в 20 (62,50%; ДИ: 43,69-78,90%) образцах синовиальной ткани у пациентов основной группы. У пациентов контрольной группы исследования в образцах синовиальной жидкости не было выявлено специфических ампликонов при электрофоретической детекции. С применением статистического анализа (точный критерий Фишера) были установлены достоверные отличия по частоте выявления полос свечения между основной и контрольной группами при детекции фрагмента гена 16S рРНК в синовиальной жидкости ($p<0,05$) и в синовиальной ткани ($p<0,05$).

На следующем этапе образцы, успешно прошедшие этап амплификации (появление чёткой полосы свечения ПЦР-продукта) использовались для проведения секвенирующей ПЦР. Было проведено секвенирование по Сэнгеру начальной последовательности длиной 500 п.н. Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК (рисунок 2) сравнивали с последовательностями из базы данных GenBank с использованием программы BLAST.

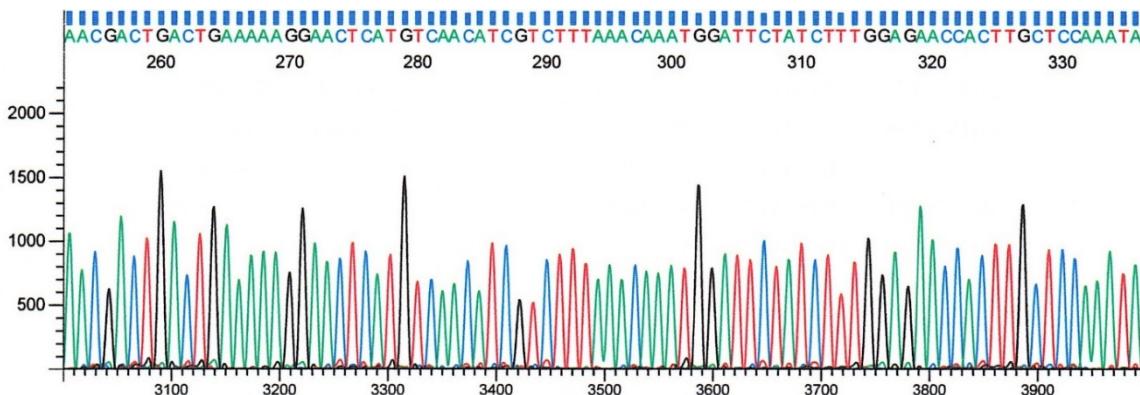


Рис. 2 – Электрофореграмма полученной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК

Идентификация на уровне рода была осуществлена относительно инвентарных номеров, депонированных в базе данных GeneBank. Таким образом, анализ методом секвенирования и последующей идентификации показал соответствие амплифицированной нуклеотидной последовательности микроорганизмам рода *Staphylococcus* в 56,25%; ДИ: 29,88-80,25% (n=9) случаев, рода *Streptococcus* – 18,75%; ДИ: 4,05-45,65% (n=3) случаев, род *Enterobacter* – 6,25%; ДИ: 0,16-30,23% (n=1) случаев, род *Klebsiella* – 6,25%; ДИ: 0,16-30,23% (n=1) случаев и род *Escherichia* в 6,25%; ДИ: 0,16-30,23% (n=1) случаев в образцах синовиальной жидкости пациентов. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК также позволило установить, что анализируемая последовательность наиболее близка к роду *Staphylococcus* в 55,00%; ДИ: 31,53-76,94% (n=11) случаев, рода *Streptococcus* – 15,00%; ДИ: 3,21-37,89% (n=3) случаев, род *Enterococcus* – 10,00%; ДИ: 1,23-31,70% (n=2)

случаев, род *Klebsiella* – 5,00%; ДИ: 0,13-24,87% (n=1) и род *Escherichia* в 5,00%; ДИ: 0,13-24,87% (n=1) случаев в образцах синовиальной ткани пациентов.

Выводы. Разработанная и апробированная методика универсального ПЦР анализа для идентификации гена 16S рРНК в сочетании с секвенированием может быть использована как референсный метод для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции после эндопротезирования крупных суставов.

Литература

1. Parvizi, J. Periprosthetic joint infection / J. Parvizi // Orthopedics. – 2011. – Vol. 34, iss. 6. – P. 448. DOI: 10.3928/01477447-20110427-18.
2. Helwig, P. Periprosthetic joint infection-effect on quality of life / P. Helwig [et al.] // Int. Orthop. – 2014. – Vol. 38, iss. 5. – P. 1077–1081. DOI: 10.1007/s00264-013-2265-y.