



Лямцева А.К.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

ПЦР-анализ в сочетании с секвенированием для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов при установлении этиологии перипротезной инфекции суставов

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 19.02.2025

Принята: 30.07.2025

Контакты: annliamtsava@gmail.com

Резюме

Введение. Ген 16S рРНК – эволюционно сохраненный ген, встречающийся исключительно у бактерий и архей, выступающий в роли молекулярной мишени для идентификации микроорганизмов на уровне рода, вида. ПЦР гена 16S рРНК представляет собой привлекательную альтернативу для обнаружения и идентификации бактериальных патогенов в клинических образцах пациентов с перипротезной инфекцией суставов, у которых имеется высокое подозрение на инфекцию, но бактериальные культуры отрицательны.

Цель. Разработать и апробировать метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов в сочетании с секвенированием в синовиальной жидкости и синовиальной ткани для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции, обусловленной эндопротезированием коленного, тазобедренного суставов.

Материалы и методы. Проведена амплификация гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров с последующей детекцией результатов методом электрофореза. С помощью секвенирования по Сэнгеру проведена идентификация условно-патогенных микроорганизмов. Проведена оценка диагностической эффективности различных методов микробиологической диагностики перипротезной инфекции.

Результаты. Были установлены достоверные отличия по частоте выявления специфических ампликонов размером около 1500 пар нуклеотидов между основной и контрольной группами при электрофоретической детекции гена 16S рРНК в синовиальной жидкости и в синовиальной ткани. Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК показал высокую чувствительность (82,8% (95% ДИ: 71,8–90,1%)) и специфичность (95,0% (95% ДИ: 76,4–99,1%)) по сравнению с бактериологическим методом исследования (показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста – 70,3% (95% ДИ: 58,2–80,1%) и 90,0% (95% ДИ: 69,9–97,2%) соответственно) биологического материала пациентов с перипротезной инфекцией суставов.



Заключение. Амплификация и секвенирование гена 16S рРНК имеет высокую диагностическую эффективность и позволяет идентифицировать условно-патогенные бактерии, участвующие в этиологии перипротезной инфекции суставов.

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

Lyamtseva A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

PCR Analysis Combined with Sequencing for Identifying the 16S rRNA Gene of Opportunistic Microorganisms in Establishing the Etiology of Periprosthetic Joint Infection

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 19.02.2025

Accepted: 30.07.2025

Contacts: annaliamtseva@gmail.com

Abstract

Introduction. The 16S rRNA gene is an evolutionarily conserved gene found exclusively in bacteria and archaea, and acting as a molecular target for identifying microorganisms at the genus and species level. 16S rRNA gene PCR represents an attractive alternative for detecting and identifying bacterial pathogens in clinical specimens from patients with periprosthetic joint infection presenting a high suspicion of infection but negative bacterial cultures.

Purpose. To elaborate and approve a universal PCR analysis method for identifying the 16S rRNA gene of opportunistic pathogens in combination with sequencing in synovial fluid and synovial tissue for etiologic identification of pathogens responsible for periprosthetic infection caused by knee and hip joint endoprosthesis replacement.

Materials and methods. Amplification of the 16S rRNA gene was performed using universal primers with subsequent detection of the results by electrophoresis. Sanger sequencing was used to identify opportunistic microorganisms. The diagnostic efficiency of various methods of microbiologic diagnostics of periprosthetic infection was evaluated.

Results. Significant differences were found in the frequency of detection of specific amplicons of about 1500 base pairs between the main and control groups in the electrophoretic detection of the 16S rRNA gene in synovial fluid and synovial tissue. The PCR method in combination with sequencing of the 16S rRNA gene showed high sensitivity (82.8% (95% CI: 71.8–90.1%)) and specificity (95.0% (95% CI: 76.4–99.1%)) compared with the bacteriologic research method (sensitivity and specificity of the test being 70.3% (95% CI: 58.2–80.1%) and 90.0% (95% CI: 69.9–97.2%), respectively) of biological material from patients with periprosthetic joint infection.

Conclusion. Both amplification and sequencing of the 16S rRNA gene have high diagnostic efficiency and allows identifying opportunistic bacteria involved in the etiology of periprosthetic joint infection.

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

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших достижений в клинической практике инфекционных заболеваний стало открытие нуклеиновых кислот. Возможность обнаруживать и идентифицировать молекулы нуклеиновых кислот микроорганизмов, главным образом путем амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), создала мощное средство для быстрого обнаружения культивируемых и некультивируемых бактерий. ПЦР с использованием универсальных праймеров с последующим секвенированием продуктов амплификации в настоящее время доступна для выполнения многим лабораториям медицинских учреждений. Концепция универсальной системы обнаружения и идентификации бактерий была предложена на основе гена 16S рибосомной РНК (рРНК), эволюционно сохраненного гена, встречающегося исключительно у бактерий и архей [1]. С помощью праймеров, комплементарных этим участкам, теоретически можно установить присутствие любой бактерии.

Гены прокариотической рРНК, в частности, включают 5S, 16S, 23S и межгенные области. Наиболее эффективные методы идентификации бактерий основаны на сравнении последовательностей важнейшего гена – 16S рРНК. Этот ген кодирует последовательность РНК в составе малой субъединицы (30S) прокариотических рибосом, имеет длину около 1500 пар нуклеотидов (п. н.) (~1,5 килобазы – это среднее значение, некоторые организмы могут иметь более короткие или длинные последовательности 16S). На рибосомах осуществляется трансляция мРНК с образованием пептидных цепей. Поскольку поддержание процесса трансляции и его надежность имеют ключевое значение, они обеспечиваются высококонсервативными последовательностями гена рРНК. Эти последовательности настолько постоянны, что их можно использовать для сравнения генов филогенетически отдаленных микроорганизмов. Другие, не столь важные для процесса трансляции участки этого гена испытывают гораздо меньшее давление отбора, поэтому для каждого вида они уникальны и позволяют отличать друг от друга близкие виды [2].

Несколько последовательностей 16S могут существовать в одной бактерии, и некоторые копии могут различаться [3]. Исследования геномного секвенирования также показывают, что многие виды бактерий имеют внутригенную гетерогенность, т. е. несут в себе несколько копий гена 16S рРНК и полиморфизмы между этими копиями, что позволяет проводить межвидовое подтипирование посредством частичного или полного секвенирования. 16S рРНК был широко изучен и применен для установления описания вида, таксономии вида и филогенетических отношений [2]. Таким образом, ген 16S рРНК является молекулярной мишенью выбора для идентификации патогенов на уровне рода или вида в клинической и научно-исследовательской лаборатории из-за его повсеместной природы среди бактерий и архей, а также обилия данных о последовательности гена.



В настоящее время в общедоступных базах данных GenBank и Ribosomal Database Project представлено более 125 000 последовательностей гена 16S рРНК бактерий. В настоящее время, чтобы идентифицировать новую бактерию, достаточно сравнить последовательность ее 16S рРНК с имеющимися в этих базах последовательностями, воспользовавшись для этого поисковой системой BLAST. Консервативные и вариабельные области гена 16S можно использовать в качестве объектов исследования с помощью ПЦР. Для изучения ранее неизвестных бактерий участок гена 16S любых бактерий можно амплифицировать, используя праймеры, гомологичные его консервативным последовательностям. С помощью праймеров, гомологичных видоспецифичным вариабельным областям этого гена, можно выявлять соответствующие бактерии в клиническом материале [4].

Перипротезная инфекция (ППИ) суставов является одним из самых серьезных осложнений в ортопедической хирургии. Последствия ППИ включают рецидивирующие инфекции, повторные хирургические ревизии, длительные курсы противомикробной терапии и высокую нагрузку как на качество жизни пациента, так и на общие расходы на здравоохранение [5]. Известно, что наиболее распространенными возбудителями ППИ являются грамположительные бактерии, особенно *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, за которыми следуют грамотрицательные бактерии. Учитывая широкий спектр потенциальных микроорганизмов как этиологического фактора ППИ, окончательная идентификация микробного агента является обязательной для оптимизации хирургической стратегии и начала соответствующей долгосрочной антибиотикотерапии [6].

ПЦР 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.

Исследования по использованию метода ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру гена 16S рРНК немногочисленны. В проспективном исследовании Marín M. и соавт. [7] было показано, что ПЦР-анализ гена 16S рРНК существенно повысил специфичность диагностики ППИ и имел лучшую положительную прогностическую ценность (96,3% и 91,7% соответственно), чем бактериологический метод исследования. Данный метод требовал также меньшего количества образцов и предоставлял возможность получения результатов в течение 24 часов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать и апробировать метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов в сочетании с секвенированием в синовиальной жидкости и синовиальной ткани для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции, обусловленной эндопротезированием коленного, тазобедренного суставов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основную группу исследования были включены 32 пациента с наличием признаков ППИ, которым за период с 2022 по 2024 г. в УЗ «Минская областная клиническая больница» (УЗ «МОКБ») было проведено первичное эндопротезирование тазобедренного или коленного сустава. В контрольную группу были включены

10 пациентов после эндопротезирования тазобедренного или 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) год, 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).

Критериями включения пациентов в основную группу исследования после эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава являлись:

- локальный отек тканей, болезненность при пальпации, местное повышение температуры, гиперемия кожных покровов, нарушение функции тазобедренного или коленного сустава;
- жалобы на повышение температуры тела, острое появление боли или любая хроническая боль в области эндопротеза на любом сроке после имплантации в первые несколько лет после установки эндопротеза, особенно при полном отсутствии безболевого периода после операции, проблемы с заживлением послеоперационной раны, поверхностная или глубокая инфекция;
- наличие свищевого хода, связанного с костью или имплантатом;
- наличие классических клинических симптомов воспаления в совокупности с признаками синдрома системной воспалительной реакции;
- наличие септического артрита смежных суставов;
- сочетанное превышение пороговых уровней в сыворотке крови 10 мг/л для СРБ и 30 мм/ч для СОЭ у пациентов с клиническими признаками ППИ (лихорадка, необъяснимая боль в месте артропластики, расшатывание эндопротеза и т. д.);
- превышение содержания в синовиальной жидкости лейкоцитов более 3000 клеток/мкл и долей палочкоядерных нейтрофилов более 70,0%;
- рентгенологически подтвержденное расшатывание компонентов эндопротеза.

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

На базе УЗ «МОКБ» было проведено бактериологическое исследование биологического материала (посев на жидкую и плотную питательные среды) пациентов основной и контрольной группы исследования. Дальнейшие исследования были проведены на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Выделение ДНК из синовиальной жидкости проводили с использованием готового коммерческого набора реагентов «АртДНК Легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выделения ДНК из синовиальной ткани применяли предварительную



гомогенизацию в течение 3 минут (частота 10/с) с использованием гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) с последующей экстракцией набором реагентов «АртСпин» («АртБиоТех», Республика Беларусь), 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 ($A_{260/280}$).

Аmplификацию проводили с использованием универсальных прокариотических праймеров: fD1 (прямой, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rP2 (обратный, 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), нацеленных на гипервариабельные области V1 и V3 в гене 16S рПНК. Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Республика Беларусь); 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 °С – 2 мин.; далее 30 циклов (денатурация при 94 °С – 30 с., отжиг праймеров при 55 °С – 30 с., элонгация при 72 °С – 1 мин.), финальная элонгация при 72 °С 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 GloBина человека амплифицировали для каждого образца с праймерами β GloF (прямой, 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') и β GloR (обратный, 5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3'). Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «2X премикс для ПЦР-РВ» («Прайтех», 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 включала следующие стадии: начальная денатурация при 94 °С – 5 мин.; далее 35 циклов (денатурация при 94 °С – 30 с., отжиг праймеров при 55 °С – 30 с., элонгация при 72 °С – 30 с.), финальная элонгация при 72 °С 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 мг/л) 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 рПНК имели размер примерно 1500 п. н. Амплифицированные образцы хранили при –20 °С.

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

Первые 500 п. н. гена 16S рПНК 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 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_{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.

Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту – долю (%) от общего числа случаев в исследуемой группе и 95% доверительный интервал (95% ДИ) методом Клоппера – Пирсона.

Для сопоставления эффективности различных методов диагностики рассчитывали:

- диагностическую чувствительность (ДЧ): $ДЧ = \frac{ИП \text{ (истинно положительные результаты теста)}}{ИП + ЛО \text{ (ложноотрицательные результаты теста)}} \times 100\%$;
- диагностическую специфичность (ДС): $ДС = \frac{ИО \text{ (истинно отрицательные результаты теста)}}{ИО + ЛП \text{ (ложноположительные результаты теста)}} \times 100\%$;
- прогностическую ценность положительного (ПЦ+) результата: $ПЦ+ = \frac{ИП}{ИП + ЛП} \times 100\%$;
- прогностическую ценность отрицательного (ПЦ-) результата: $ПЦ- = \frac{ИО}{ИО + ЛО} \times 100\%$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

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 (Ct) при амплификации house-keeping гена β -глобина человека (табл. 1).

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,

Таблица 1
Значения соотношения $A_{260/280}$ и пороговых циклов, полученные при выделении ДНК (Me (Q_{25}/Q_{75}))
Table 1
Values of the ratio between $A_{260/280}$ and threshold cycles obtained during DNA extraction (Me (Q_{25}/Q_{75}))

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



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 о том, 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 рис. 1 представлен электрофоретический анализ полученных ампликонов из синовиальной ткани пациентов основной группы.

При электрофоретическом анализе были зафиксированы четкие полосы свечения на уровне, соответствующем массе специфического ампликона, в 26 (81,3%; 95% ДИ: 63,6–92,8%) образцах синовиальной жидкости и в 27 (84,4%; 95% ДИ: 67,2–94,7%) образцах синовиальной ткани у пациентов основной группы. У пациентов контрольной группы в образцах синовиальной жидкости был детектирован 1 (10,0%; 95% ДИ: 0,3–44,5%) специфический ампликон при электрофоретической детекции, в образцах синовиальной ткани не было выявлено специфических ампликонов. С применением статистического анализа (точный критерий Фишера) были установлены достоверные отличия по частоте выявления полос свечения между основной

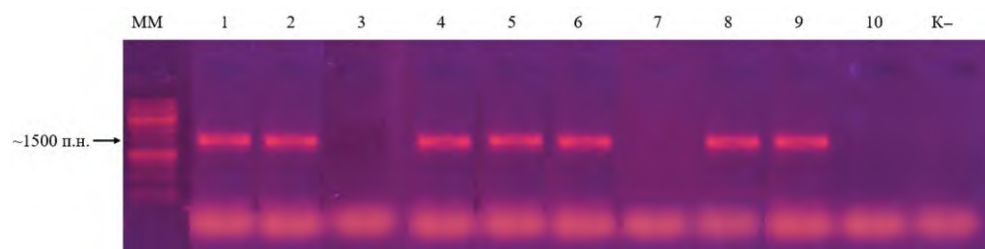


Рис. 1. Визуализация амплифицированного гена 16S рРНК. MM – маркер молекулярной массы ДНК; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 – положительные образцы; 3, 7, 10 – отрицательные образцы; K– – отрицательный контроль (вода)

Fig. 1. Visualization of the amplified fragment of the 16S rRNA gene. MM – DNA molecular weight marker; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 – positive samples; 3, 7, 10 – negative samples; K– – negative control (water)

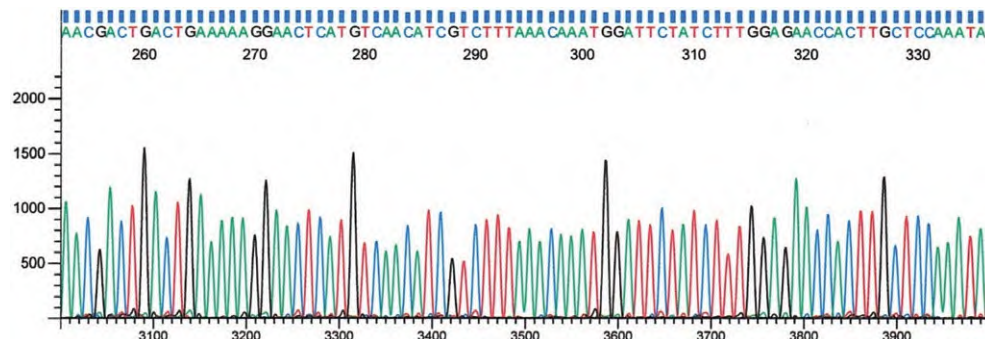


Рис. 2. Электрофореграмма полученной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК
Fig. 2. Electropherogram of the obtained nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment

и контрольной группами при детекции 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 четкой полосы свечения ПЦР-продукта), использовались для проведения секвенирующей ПЦР. Было проведено секвенирование по Сэнгеру начальной последовательности длиной 500 п. н. Полученные нуклеотидные последовательности гена

Таблица 2
Результаты выявления условно-патогенных микроорганизмов у основной группы пациентов
Table 2
Results of detection of opportunistic microorganisms in the main groups of patients

Название микроорганизма	Количество выявленных микроорганизмов			
	синовиальная жидкость (n=32)		синовиальная ткань (n=32)	
	методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, n (%; 95% ДИ)	бактериологическим методом, n (%; 95% ДИ)	методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, n (%; 95% ДИ)	бактериологическим методом, n (%; 95% ДИ)
1	2	3	4	5
Грамположительные бактерии	19 (59,38; 40,64–76,30)	16 (50,00; 31,89–68,11)	20 (62,50; 43,69–78,90)	18 (56,25; 37,66–73,64)
Staphylococcus aureus	7 (36,84; 16,29–61,64)	5 (31,25; 11,02–58,66)	7 (35,00; 15,39–59,22)	5 (27,78; 9,69–53,48)
Staphylococcus epidermidis	4 (21,05; 6,05–45,57)	2 (12,50; 1,55–38,35)	4 (20,00; 5,73–43,66)	3 (16,67; 3,58–41,42)
Staphylococcus lugdunensis	1 (5,26; 0,13–26,03)	0 (0,00; 0,00–20,59)	1 (5,00; 0,13–24,87)	0 (0,00; 0,00–18,53)
Streptococcus spp.	1 (5,26; 0,13–26,03)	1 (6,25; 0,16–30,23)	2 (10,00; 1,23–31,70)	1 (5,56; 0,14–27,29)
Propionibacterium acnes	2 (10,53; 1,30–33,14)	1 (6,25; 0,16–30,23)	2 (10,00; 1,23–31,70)	2 (11,11; 1,38–34,71)
Enterococcus faecalis	3 (15,79; 3,38–39,58)	4 (25,00; 7,27–52,38)	3 (15,00; 3,21–37,59)	4 (22,22; 6,41–47,64)
Finegoldia magna	1 (5,26; 0,13–26,03)	3 (18,75; 4,05–45,65)	1 (5,00; 0,13–24,87)	3 (16,67; 3,58–41,42)
Грамотрицательные бактерии	7 (21,88; 9,28–39,97)	5 (15,62; 5,28–32,79)	7 (21,88; 9,28–39,97)	6 (18,75; 7,21–36,44)
Escherichia coli	3 (42,86; 9,90–81,59)	2 (40,00; 5,27–85,34)	3 (42,86; 9,90–81,59)	2 (33,33; 4,33–77,72)
Enterobacter cloacae	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (20,00; 0,51–71,64)	1 (14,29; 0,36–57,87)	2 (33,33; 4,33–77,72)
Klebsiella pneumoniae	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00)	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00–45,93)
Proteus mirabilis	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00)	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00–45,93)
Serratia marcescens	0 (0,00; 0,00–40,96)	1 (20,00; 0,51–71,64)	0 (0,00; 0,00–40,96)	1 (16,67; 0,42–64,12)
Pseudomonas aeruginosa	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (20,00; 0,51–71,64)	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (16,67; 0,42–64,12)
Не выявлено	6 (18,75; 7,21–36,44)	11 (34,38; 18,57–53,19)	5 (15,62; 5,28–32,79)	8 (25,00; 11,46–43,40)



16S рРНК (рис. 2) сравнивали с последовательностями из базы данных GenBank с использованием программы BLAST.

Результаты идентификации микроорганизмов с помощью метода секвенирования гена 16S рРНК, а также бактериологическим методом в синовиальной жидкости и синовиальной ткани пациентов основной группы представлены в табл. 2.

В синовиальной жидкости пациентов контрольной группы методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК было детектировано наличие *Staphylococcus aureus* (n=1, 10,00%; ДИ: 0,25–44,50%), методом бактериологического посева у 2 пациентов (20,00%; ДИ: 2,52–55,61%) – *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecalis*. В синовиальной ткани пациентов контрольной группы как методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, так и методом бактериологического посева условно-патогенных микроорганизмов выявлено не было.

В результате анализа полученных данных установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК в синовиальной жидкости (p=0,0098) и в синовиальной ткани (p=0,0006) пациентов.

С использованием методов статистического анализа установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий бактериологическим методом в синовиальной ткани пациентов (p=0,0022).

У 3 пациентов (9,4%; 95% ДИ: 2,0–25,0%) основной группы методом ПЦР гена 16S рРНК с последующим секвенированием выявленные возбудители также присутствовали в составе полимикробной инфекции: *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* + *Streptococcus spp.*, что дает основание предполагать, что они формируют биологические сообщества в виде биопленок, а значит, обладают уникальной способностью минимизировать влияние защитных факторов организма человека.

Таблица 3
Диагностическая эффективность методов диагностики ППИ в различном биологическом материале исследуемых пациентов
Table 3
Diagnostic efficiency of methods for diagnosing PJI in various biological materials from patients under study

Название метода исследования	ДЧ, % (95% ДИ)	ДС, % (95% ДИ)	ПЦ+, % (95% ДИ)	ПЦ-, % (95% ДИ)
1	2	3	4	5
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	82,8 (71,8–90,1)	95,0 (76,4–99,1)	98,1 (90,2–99,7)	63,3 (45,5–78,1)
Бактериологический метод	70,3 (58,2–80,1)	90,0 (69,9–97,2)	95,7 (85,8–98,8)	48,6 (33,4–64,1)
Синовиальная жидкость				
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	81,3 (64,7–91,1)	90,0 (59,6–98,2)	96,3 (81,7–99,3)	60,0 (35,7–80,2)
Бактериологический метод	65,6 (48,3–79,6)	80,0 (49,0–94,3)	91,3 (73,2–97,6)	42,1 (23,1–63,7)
Синовиальная ткань				
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	84,4 (68,2–93,1)	100,0 (72,2–100,0)	100,0 (87,5–100,0)	66,7 (41,7–84,8)
Бактериологический метод	75,0 (57,9–86,7)	100,0 (72,2–100,0)	100,0 (86,2–100,0)	55,6 (33,7–75,4)

В табл. 3 представлены данные, отображающие диагностическую эффективность различных методов микробиологической диагностики ППИ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что ПЦР-анализ с использованием универсальных праймеров с последующим анализом методом секвенирования повышает чувствительность и специфичность микробиологической диагностики ППИ. Сравнительные исследования разного биологического материала от пациентов с ППИ коленного/тазобедренного сустава показали наиболее высокую диагностическую ценность синовиальной ткани для молекулярно-биологической диагностики по сравнению с синовиальной жидкостью, что позволяет рекомендовать именно этот вид биологического материала для установления этиологического микробного фактора при ППИ, обусловленной эндопротезированием крупных суставов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ППИ суставов связана с серьезными осложнениями, потерей трудоспособности и высокими затратами на лечение, что обуславливает необходимость постановки этиологически правильного диагноза. Использование методов молекулярной диагностики позволяет быстро идентифицировать ДНК возбудителя и своевременно назначать таргетную антимикробную терапию.

Были установлены достоверные отличия по частоте выявления специфических ампликонов размером около 1500 пар нуклеотидов между основной и контрольной группами при электрофоретической детекции гена 16S рРНК в синовиальной жидкости и в синовиальной ткани.

С использованием точного критерия Фишера установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК в синовиальной жидкости ($p=0,0098$) и в синовиальной ткани ($p=0,0006$) пациентов. Также установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий бактериологическим методом в синовиальной ткани пациентов ($p=0,0022$).

Разработанный и апробированный метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК в сочетании с секвенированием по сравнению с бактериологическим методом исследования показал высокую чувствительность (82,8% (95% ДИ: 71,8–90,1%)) и специфичность (95,0% (95% ДИ: 76,4–99,1%)) теста. Данный метод может быть использован как референсный для этиологической идентификации возбудителей ППИ.

Сравнительные исследования разного биологического материала показали наиболее высокую диагностическую ценность исследования синовиальной ткани: диагностическая чувствительность – 84,4% (95% ДИ: 68,2–93,1%), диагностическая специфичность – 100,0% (95% ДИ: 72,2–100,0%) для разработанного метода молекулярной диагностики ППИ после эндопротезирования крупных суставов.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Raoult D., Fournier P.E., Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:151–159. doi: 10.1038/nrmicro820
2. Church D.L., Cerutti L., Gürtler A., et. al. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(4):e00053-19. doi: 10.1128/CMR.00053-19
3. Větrovský T., Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 2013;8(2):e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923
4. Peker N., Garcia-Croes S., Dijkhuizen B., et. al. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S-23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. *Front Microbiol.* 2019;10:620. doi: 10.3389/fmicb.2019.00620
5. Helwig P., Morlock J., Oberst M., et. al. Periprosthetic joint infection—effect on quality of life. *Int Orthop.* 2014;38(5):1077–1081. doi: 10.1007/s00264-013-2265-y
6. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P.E. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351(16):1645–1654. doi: 10.1056/NEJMr040181
7. Marín M., Garcia-Lechuz J.M., Alonso P., et. al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):583–589. doi: 10.1128/JCM.00170-11