

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-1-45-51

УДК: 616-093/-098

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОМИЕЛИТА ЧЕЛЮСТЕЙ

Файзуллина Г. А., Мирсаева Ф. З.

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Аннотация

Предмет исследования — значение молекулярно-генетических методов исследования в изучении этиопатогенеза остеомиелита челюстей.

Цель работы — представить актуальную информацию исследователям, врачам-стоматологам-хирургам, челюстно-лицевым хирургам по возможностям молекулярно-генетических исследований в вопросах выявления бактериальных патогенов при остеомиелите челюстей, а также отразить генетические маркеры факторов патогенности ряда основных возбудителей заболевания.

Методология. Использованы международные научные базы данных PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Collaboration, Elsevier, а также электронные каталоги eLIBRARY.RU и КиберЛенинка.

Результаты. Обзор публикаций продемонстрировал, что *S. aureus* и *S. Epidermidis* доминируют в этиологическом спектре возбудителей инфекционных процессов костной ткани. Участие данных микроорганизмов определяется целым спектром факторов патогенности. В патогенезе остеомиелита и прогрессировании заболевания главную роль играют токсины и гены лейкоцидин Пантона–Валентайна (PVL). Показано, что патогенные бактерии *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* способны индуцировать дифференцированную продукцию цитокинов. Наибольшее внимание привлекает *E. faecium*, который проявляет мультирезистентность к широкому спектру антибиотиков. Доля инфекций, опосредованных *S. epidermidis*, *S. Saprophyticus* составляет, в среднем, порядка 25% случаев. Доля представителей грамотрицательной флоры *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* достигает 23% случаев. Патогенные нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa* также вовлечены в формирование хронического воспаления при остеомиелите. По результатам опубликованных исследований, более трети случаев хронического остеомиелита опосредовано микробными ассоциациями, в составе которых доминируют *S. aureus*, *S. epidermidis* и реже *E. faecalis*.

Выводы. Применение ПЦР-анализа для идентификации возбудителей остеомиелита и амплификация генов с использованием специфичных праймеров имеет огромное преимущество перед рутинными микробиологическими тестами, являясь информативным методом исследования факторов патогенности основных возбудителей. Высокая значимость молекулярно-генетических методов в изучении этиопатогенеза остеомиелита челюстей требует их широкого применения в клинике хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для успешного решения сложных задач по реабилитации пациентов с данным заболеванием.

Ключевые слова: обзор литературы, остеомиелит челюсти, ПЦР, молекулярно-генетические методы исследования, генетические маркеры возбудителей остеомиелита

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Гузель Ахтямовна ФАЙЗУЛЛИНА ORCID ID 0000-0002-0855-6578

к.м.н., доцент кафедры хирургической стоматологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия
flamingo004@yandex.ru

Фания Зартиновна МИРСАЕВА ORCID ID 0000-0002-8956-0690

д.м.н., профессор, профессор кафедры хирургической стоматологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия
faniya-mirsaeva@mail.ru

Адрес для переписки: Гузель Ахтямовна ФАЙЗУЛЛИНА
450057, Респ. Башкортостан, г. Уфа, ул. Новомостовая, 8–202
+7 (917) 4096767
flamingo004@yandex.ru

Образец цитирования:

Файзуллина Г. А., Мирсаева Ф. З.

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ
ОСТЕОМИЕЛИТА ЧЕЛЮСТЕЙ. Проблемы стоматологии. 2024; 1: 45-51.

© Файзуллина Г. А. и др., 2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-1-45-51

Поступила 14.10.2023. Принята к печати 23.02.2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-1-45-51

ROLE OF MOLECULAR GENETIC RESEARCH METHODS IN THE ETIOPATHOGENESIS OF OSTEOMYELITIS OF THE JAWS

Fayzullina G.A., Mirsaeva F.Z.

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Annotation

The subject of the study is the importance of molecular genetic research methods in the study of the etiopathogenesis of osteomyelitis of the jaws.

The purpose of the work is to provide up-to-date information to researchers, dental surgeons, and maxillofacial surgeons on the possibilities of molecular genetic research in identifying bacterial pathogens in osteomyelitis of the jaws, as well as to reflect genetic markers of pathogenicity factors for a number of the main causative agents of the disease.

Methodology. International scientific databases PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Collaboration, Elsevier, as well as electronic catalogs eLIBRARY.RU and CyberLeninka.ru were used.

Results. A review of publications demonstrated that *S. aureus* and *S. epidermidis* dominate the etiological spectrum of causative agents of bone tissue infections. The participation of these microorganisms is determined by a whole range of pathogenicity factors. Toxins and Pantone-Valentine leukocidin (PVL) genes play a major role in the pathogenesis of osteomyelitis and disease progression. It has been shown that the pathogenic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* are capable of inducing differentiated production of cytokines. The most attention has been attracted to *E. faecium*, which exhibits multidrug resistance to a wide range of antibiotics. The proportion of infections mediated by *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* is, on average, about 25% of cases. The proportion of representatives of gram-negative flora *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* reaches 23% of cases. Pathogenic nosocomial strains of *P. aeruginosa* are also involved in the formation of chronic inflammation in osteomyelitis. According to the results of published studies, more than a third of cases of chronic osteomyelitis are mediated by microbial associations, which are dominated by *S. aureus*, *S. epidermidis* and, less commonly, *E. faecalis*.

Conclusions. The use of PCR analysis to identify the causative agents of osteomyelitis and gene amplification using specific primers has a huge advantage over routine microbiological tests, being an informative method for studying the pathogenicity factors of the main pathogens. The high importance of molecular genetic methods in the study of the etiopathogenesis of osteomyelitis of the jaws requires their widespread use in the clinic of surgical dentistry and maxillofacial surgery to successfully solve complex problems in the rehabilitation of patients with this disease.

Keywords: literature review, osteomyelitis of the jaw, PCR, molecular genetic research methods, genetic markers of osteomyelitis pathogens

The authors declare no conflict of interest.

Guzel A. FAYZULLINA ORCID ID 0000-0002-0855-6578

PhD in Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Surgical Dentistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
flamingo004@yandex.ru

Faniya Z. MIRSAEVA ORCID ID 0000-0002-8956-0690

Grand PhD in Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Surgical Dentistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
faniya-mirsaeva@mail.ru

Correspondence address: Guzel A. FAYZULLINA

450057, Republic of Bashkortostan, Ufa, Novomostovaya 8–202

+7 (917) 4096767

flamingo004@yandex.ru

For citation:

Fayzullina G.A., Mirsaeva F.Z.

ROLE OF MOLECULAR GENETIC RESEARCH METHODS IN THE ETIOPATHOGENESIS OF OSTEOMYELITIS OF THE JAWS. *Actual problems in dentistry*. 2024; 1: 45-51. (In Russ.)

© Fayzullina G.A. et al., 2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-1-45-51

Received 14.10.2023. Accepted 23.02.2024

Идентификация возбудителей хронического остеомиелита является ключом к успешной терапии заболевания. Вместе с тем, чувствительность рутинных микробиологических анализов недостаточно высока.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод молекулярной диагностики, известный еще с конца прошлого века. Она позволяет определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР также позволяет диагностировать наличие долго растущих возбудителей, не прибегая к трудоемким микробиологическим методам. Несмотря на то, что на современном этапе молекулярно-генетические методы на основе ПЦР имеют огромную диагностическую ценность [1–6], в клиниках хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии они не нашли широкого применения.

Совместное использование классических методов микробиологических тестов и ПЦР-анализа привело к обнаружению патогена в 62,8% случаев [1]. Высокая чувствительность молекулярно-генетических методов на основе полимеразной цепной реакции при идентификации возбудителей инфекционного процесса определила поиск актуальных для клинической практики генетических праймеров [6, 7].

Цель исследования — представить актуальную информацию исследователям, врачам-стоматологам-хирургам, челюстно-лицевым хирургам по возможностям молекулярно-генетических исследований в вопросах выявления бактериальных патогенов при остеомиелите челюстей, а также отразить генетические маркеры факторов патогенности ряда основных возбудителей заболевания.

Материалы и методы

Проведена поисковая работа с использованием международных научных баз данных PubMed, ScienceDirect, Scopus, Cochrane Collaboration, Elsevier, а также электронных каталогов eLIBRARY.RU и CyberLeninka.ru по микробиологическим аспектам этиологии остеомиелита челюстей.

Результаты

А.К. Szafranska и соавт. [8] в экспериментах *in vivo*, проанализировав транскрипционную адаптацию *S. aureus* при инфекции костной ткани, определили транскриптом возбудителя при острой и хронической фазах воспаления. Используя РНК-секвенирование, А.К. Szafranska и соавт. [8] оценили в общей сложности 180 генов, экспрессируемых *S. aureus* при острой или хронической инфекции костной ткани. В результате проведенного исследования было показано, что при остром остеомиелите *S. aureus* индуцировал транскрипцию генов, обеспечивающих метаболическую адаптацию, уклонение от иммунитета и репликацию.

Во время хронической фазы воспаления *S. aureus* трансформировал транскрипционный ответ с пролиферативного режима на персистентный, вероятно, из-за серьезного дефицита в поставках питательных веществ. А.К. Szafranska и соавт. [8] показали, что только во время инфекции *S. aureus* экспрессирует ряд генов, кодирующих секреторные протеолитические ферменты (*aur*, *sspA*, *sspB*, *scpA* и *splABCEF*). Как отмечают авторы публикации, в образцах костной ткани человека регистрируется высокая экспрессия гена *sspB*. Преимущественно во время хронического остеомиелита *S. aureus* индуцировался путь, кодируемый опероном аргининдеиминазы (*arc*). Этот путь позволяет *S. aureus* использовать аргинин в качестве источника энергии в анаэробных условиях.

Огромный массив детерминант вирулентности *S. aureus* очень строго контролируется генами двухкомпонентных регуляторных систем *agrAC* и *saeRS*, а также семейством генов *sarA* [8, 9]. В экспериментальном исследовании А.К. Szafranska и соавт. показали, что при инфекции костной ткани снижается экспрессия *agr*, тогда как локусы, кодирующие систему *saeRS*, экспрессировались на очень высоком уровне [8]. В то же время известно, что полиморфизм аминокислотной последовательности аутоиндуцирующего пептида и его соответствующего рецептора (*agrC*) позволяет выделить четыре основные группы штаммов *S. aureus*. Есть данные, отражающие связь различных нозологий с представителями определенной *agr*-группы. S. Jarraud и соавт. [9] исследовали связь между группами *agr S. aureus* и различными нозологическими формами гнойно-воспалительной патологии человека. Анализируемые штаммы *S. aureus* были получены от бессимптомных носителей (n = 14), пациентов с гнойной инфекцией (n = 66) и пациентов с острой токсемией (n = 114). В цитируемой публикации приводятся олигонуклеотидные праймеры и эталонные штаммы, используемые для обнаружения гена токсинов и факторов вирулентности *S. aureus*. S. Jarraud и соавт. [9] методом ПЦР-анализа изучили распределение группы *agr* и 24 генов токсинов в штаммах *S. aureus* и резюмировали, что штаммы *S. aureus*, ассоциированные с гнойными инфекциями, в основном принадлежали к филогенетической группе AF2 и группам Agr I и II. В то же время, по данным цитируемого исследования, часть штаммов, ассоциированных с развитием остеомиелита, принадлежит к филогенетической группе AF3 и Agr-III типу; они являются наиболее частой причиной токсического шока.

Более высокая экспрессия локуса *sarA* может быть ответственна за высокий уровень генов, кодирующих фибронектин- и фибриноген-связывающие белки, а также генов, кодирующих α -, β - и δ -токсины при острой и хронической фазах воспаления костной ткани [8, 10]. Результаты, полученные на экспериментальных моделях, позволяют предположить, что штаммы *S. aureus*, которые специфически экспрессируют рецепторы для костного

сиалопротеина, коллагена и фибронектина, связаны с остеомиелитом и артритом [11–14]. Известно, что существует два фибронектин-связывающих белка (FnbpA и -B) и три рецептора для фибриногена (факторы коагуляции A и B [ClfA и -B] и фибриноген-связывающий белок [Fib]). Кроме того, некоторые MSCRAMM связываются с более чем одной молекулой матрицы (например, FnbpA связывается как с фибронектином, так и с фибриногеном) [11, 15]. Методом мультиплексного ПЦР-анализа A. Tristan и соавт. [11] проанализировали распределение девяти генов MSCRAMM в изолятах *S. aureus* от пациентов с инвазивными инфекциями и бессимптомных носителей. A. Tristan и соавт. [11] приводят перечень нуклеотидных последовательностей и размеров ампликонов для геноспецифических олигонуклеотидных праймеров *S. aureus*. В результате проведенного анализа было показано, что для штаммов *S. aureus*, ассоциированных с остеомиелитом, характерно наличие bbr специфического гена системы MSCRAMM [11]. Экспериментально показано, что в условиях хронической инфекции индуцировалась система RelA/SpoT. Инвазия костной ткани *S. aureus* ассоциирована с генами, кодирующими такие токсины, как α -гемолизин, γ -гемолизин (*hlgAB*, *hlgCB*), и лейкоцидины (*LukED*, *LukAB*), а также гены, кодирующие фенол-растворимые модулины (PSM) [8, 16].

В серии экспериментальных исследований на животных моделях была продемонстрирована перспектива применения ПЦР-анализа при идентификации *S. aureus* в образцах костной ткани [2, 3, 8]. При моделировании экспериментального хронического травматического остеомиелита у мышей K. Nishitani и соавт. [2] получили отрицательные результаты рутинного микробиологического исследования в 80% случаев инфицирования *S. aureus*, тогда как методом ПЦР возбудитель был идентифицирован у 87,5% животных. Используемые последовательности праймеров включали 16S рРНК и мышинный актин. Малые регуляторные РНК (рРНК) представляют собой дополнительный уровень посттранскрипционной регуляции генов, позволяющей патогену адаптироваться к его метаболическим потребностям во время инфекции и экспрессировать гены вирулентности [8, 17].

В другом экспериментальном исследовании B.D. Mariani и соавт. [3] продемонстрировали высокую диагностическую ценность молекулярно-генетических тестов в мониторинге хронического остеомиелита. Для идентификации *S. aureus* авторы исследования использовали праймеры ПЦР-анализа для универсального бактериального гена (16S рРНК) и последовательности для прямого и обратного праймеров, комплементарных гену специфической термостабильной нуклеазы (*nuc*). Молекулярный диагностический метод продемонстрировал высокую чувствительность и селективность, позволяя идентифицировать патогены при низком титре, не выявляемые рентгенографическими и микробиологическими

тестами. Внеклеточную термостабильную нуклеазу (*nuc*) штаммы *S. aureus* продуцируют с частотой, сходной со скоростью экспрессии коагулазы [5, 18]. *Nuc* представляет собой эндонуклеазу с молекулярной массой 17 000 Да, катализирующую распад ДНК и РНК. Известный рутинный ферментативный тест на продукцию эндонуклеазы обладает недостаточной специфичностью в отношении *S. aureus*, тогда как ПЦР-анализ характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью при идентификации возбудителя [5].

Общеизвестно клиническое и эпидемиологическое значение распространения метициллин (оксациллин)-резистентных штаммов *S. aureus* (MRSA), частота которых в отдельных стационарах в России достигает 50–60% [7]. F. Vandenesch и соавт., проанализировав наличие общих генетических маркеров среди 117 изолятов MRSA из США, Франции, Швейцарии, Австралии, Новой Зеландии и Западного Самоа, установили наличие общих стафилококковых хромосомных кассет SCCmec типа IV и локуса PVL для штаммов с каждого континента. Результаты цитируемого исследования базируются на ПЦР-анализе 24 факторов вирулентности и детерминант метициллин-резистентности *S. aureus* [16]. Соответственно, характерным признаком (маркером) эпидемических клонов MRSA является продукция лейкоцидина Пантона–Валентайна (PVL) — двухкомпонентного токсина, ассоциированного с тяжелыми некротизирующими поражениями тканей [7, 16]. PVL, разрушая полиморфно-ядерные клетки путем некроза или апоптоза, имеет большое значение в вирулентности *S. aureus* [16, 19]. Y. Duman и соавт. [19] акцентируют внимание на неблагоприятном прогнозе инфекционных осложнений ортопедических хирургических вмешательств при инвазии PVL-положительными штаммами *S. aureus*.

В цитируемом исследовании PVL-положительные штаммы были идентифицированы у 13,9% обследованных пациентов. Согласно результатам проведенного ретроспективного клинического исследования (2013–2017 гг.; n = 101), среднее пребывание в стационаре пациентов, инфицированных PVL-положительными штаммами *S. aureus*, более чем в два раза превышало длительность терапии PVL-отрицательной инфекции. Положительная динамика серологических анализов в популяции PVL-отрицательных пациентов регистрировалась через 7–10 дней, в то время как у PVL-положительных пациентов улучшение показателей отмечалось только через 17–32 дня. Y. Duman и соавт. [19] по результатам исследования подчеркивают, что PVL-положительные штаммы *S. aureus* увеличивают риск развития остеомиелита. При этом авторы публикации предлагают идентифицировать PVL-положительные штаммы *S. aureus* методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров Luk-PV-1 и Luk-PV-2.

Кроме того, в литературе представлены варианты *S. Aureus*, экспрессирующие белок синдрома токсического шока (TSST). В связи с этим клинически и эпидемиологически значимыми штаммами являются стафилококки, устойчивые к метициллину (оксациллину) и/или продуцирующие Пантона–Валентайна лейкоцидин и белок синдрома токсического шока [7]. А.Е. Гончарым и соавт. [7] с целью идентификации *S. aureus* был предложен мультиплексный ПЦР-анализ четырех пар праймеров гена внеклеточной термонуклеазы (*nuc*), лейкоцидина Пантона–Валентайна (*PVL*), белка токсического шока (*tst*) и устойчивости к метициллину (*MecA*). Авторы изобретения считают, что они позволяют идентифицировать основные генетические варианты *S. Aureus*.

При острой и хронической инфекции костной ткани также наблюдается повышенная экспрессия *S. aureus* регуляторной системы VicR/VicK (также известная как WalK/WalR и YucG/YucF). Эта двухкомпонентная система регулирует экспрессию генов, кодирующих основной автолизин, а также *ssaA* и *isaA*, вовлеченных в синтез белков, потенциально участвующих в гидролизе пептидогликана [8, 20]. В условиях хронического воспалительного процесса костной ткани более низкий уровень экспрессии по сравнению с острой фазой воспалительной реакции продемонстрировали гены, кодирующие стресс-ассоциированные протеины (*ahpF* и *katA*), участвующие в синтезе ДНК и делении клеток (*cvfA*, *atl*, *lytM* и *pyrR*) или метаболизме аминокислот (*dhoM*, *gltA*, *glnA*, *thrBC* и *ald2*) [8].

В известной степени прогрессирующую резорбцию костной ткани при остеомиелите определяет пироптоз, одна из форм запрограммированной гибели клеток при различных инфекционных заболеваниях. Показано, что *S. aureus* индуцирует активность клеточного воспалительного сенсора NLRP3, связанного с каспазой 1. Последняя расщепляет GSDMD, приводя к образованию пор на мембране, способствующих набуханию клеток и лизису, а также высвобождению воспалительных факторов, включая IL-1 β и IL-18 в остеобластах. Кроме того, из пор высвобождается sRANK-L (растворимый рецептор-активатор лиганда ядерного фактора каппа-B). Описанные процессы впоследствии приводят к чрезмерному образованию и активации остеокластов с прогрессирующей деструкцией костной ткани. С помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени продемонстрировано значительное увеличение пироптоз-ассоциированных белков в инфицированных *S. aureus* костных фрагментах человека по сравнению с неинфицированными образцами костной ткани [21]. Описанная связь пироптоз-ассоциированных белков с инвазией *S. aureus* при остеомиелите и степенью резорбции костной ткани определяет интерес к оценке прямых и обратных праймеров NLRP3, каспазы 1 и GSDMD в качестве маркеров костной деструкции.

Микроорганизмы рода *Enterococcus* могут обладать широким спектром факторов вирулентности, что повышает вероятность возникновения энтерококковой инфекции и развития осложнений. Бухарин О.В. и соавт. [22] приводят характеристику вирулентного потенциала клинических изолятов рода *Enterococcus* (*E. faecalis* и *E. faecium*). Идентификацию штаммов с помощью мультиплексной ПЦР проводили по комплексу генов, кодирующих синтез цитолизина (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL1*), генов, обуславливающих протеолитическую активность (*gelE* и *sprE*), гена, кодирующего белки клеточной стенки, ответственные за уклонение от иммунных сил макроорганизма (*ESP*), и гена, отвечающего за синтез поверхностного белка-адгезина (*ASA*). О.В. Бухарин и соавт. [22] в работе приводят праймеры, использованные для выявления генов энтерококков. S. Shibata и соавт. [6] описывают применение ПЦР-анализа для идентификации *E. coli* при остеомиелите позвоночника. Авторы публикации предлагают амплификацию гена 16S рРНК с использованием праймеров для ПЦР 5'-TTG GAG AGT TTG ATC CTG GCT C-3' и 5'-ACG GGC GGT GTG TRC- 3'. S. Shibata и соавт. [6], проанализировав диагностическую значимость ПЦР-анализа 16S рРНК широкого спектра при остеомиелите различной локализации, резюмировали, что метод имеет преимущества перед рутинными микробиологическими тестами. Авторы цитируемой публикации считают, что применение ПЦР-анализа 16S рРНК широкого спектра позволяет идентифицировать параллельно другие патогенные микроорганизмы, повышая ценность метода в сложных клинических случаях. Среди недостатков метода S. Shibata и соавт. [6] отмечают особенности интерпретации результатов анализа, связанные с поиском последовательностей в базе данных. По мнению авторов публикации, для более широкого использования этого метода в клинических условиях необходимо подробное руководство по интерпретации данных о последовательностях.

Для идентификации *P. aeruginosa* использованы праймеры детекции *algD*-гена, кодирующего GDP-дегидрогеназу, играющие роль в продукции альгината у этого вида бактерий, *toxA*-гена, кодирующего экзотоксин А, *gyrB*-гена и *ecfX*-гена [23–25]. Также имеет место одновременная амплификация («multiplex-PCR») генов *oprI* и *oprL*, синтезирующих два липопротеина наружной мембраны, маркирующих флюоресцентную группу псевдомонад и *P. aeruginosa* соответственно [23–26]. G. Al-Ahmedi и соавт. [27] провели исследование, направленное на идентификацию изолятов *P. aeruginosa*, с помощью праймеров для генов *oprI* и *oprL*. H. Aghamollaei и соавт. [28] проанализировали специфичность быстрой идентификации *P. aeruginosa* методом ПЦР-анализа последовательностей генов *lasR* и *gyrB*. P. Khuntayaporn и соавт. [29] разработаны специфические праймеры для выявления генов MBL *P. aeruginosa*, включая гены MBL IMP-, VIM- и NDM-типа. T. Naas и соавт. [30] охарактеризо-

вали генетическую среду гена *bla_{VEB-1}* мультирезистентного клинического изолята *P. aeruginosa*. Кассетный ген *bla_{VEB-1}* первоначально был выделен из изолята *E. coli* (плазмида, интегрон). Впоследствии ген был обнаружен у нескольких грамотрицательных видов бактерий, включая изоляты *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и изоляты *Providencia stuartii*. ПЦР-анализ с праймерами, специфичными для *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{GES}* и *bla_{PER}*, не дал результата. Однако применение праймеров при анализе клинических изолятов *P. aeruginosa* (TL-1, TL-2), специфичных для генов *bla_{VEB}*, выявило 100% идентичность с геном *bla_{VEB-1}*, идентифицированным в *E. coli* MG-1.

С использованием молекулярных методов диагностики *P. aeruginosa* возможно выявление нуклеотидных последовательностей, кодирующих участки генов 16S рРНК [23, 31]. А.Р. Мавзютовым и соавт. [32] ПЦР-методом подобраны и апробированы олигонуклеотидные праймеры к гену 16S рРНК ряда возбудителей (*S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Kl. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) для их высокоспецифичной детекции в клиническом материале методом ПЦР. М.В. Кузнецова и соавт. [23] выявили клиническую рациональность применения молекулярных методов диагностики для идентификации нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* (n = 159) от больных и из больничной среды крупных хирургических стационаров. Молекулярно-генетические исследования проводили методом ПЦР с использованием родо- (Ps-for/Ps-rev) и видоспецифичных (PA-SS-F/PA-SS-R) праймеров, а также универсальных праймеров к 16S рРНК (515F/1391R). Нуклеотидные последовательности приведены в исследовании.

Молекулярно-генетические технологии широко применяются в качестве типирования клинических и природных штаммов *P. aeruginosa*. При RAPD-ПЦР используются короткие произвольные праймеры, которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига, для стандартизации процедуры чаще всего используют консенсусный праймер M13 [33, 34]. Rep-ПЦР амплифицирует повторяющиеся экстрагенные палиндромные элементы и повторяющиеся внутригенные последовательности, впервые используемые у семейства *Enterobacteriaceae* (ERIC) [33, 34]. М.В. Кузнецовой и соавт. [34] определена диагностическая значимость методов Rep- и RAPD-ПЦР для типирования клинических изолятов *P. Aeruginosa*, с использованием праймеров M13 5'-GAG GGT GGC GGT TCT (RAPD-ПЦР), ERIC-1 5'-CAC TTA GGG GTC CTC GAA TGTA, ERIC-2 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G и BOXA1R 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G (Rep-ПЦР). Была показана различная разграничивающую способность трех

реакций: индекс дискриминации Симпсона составил 0,993, 0,875 и 0,639 для RAPD-, ERIC- и BOX-ПЦР соответственно. RAPD-ПЦР позволял выявлять индивидуальные особенности штаммов. Из двух вариантов Rep-ПЦР показано преимущество ERIC-ПЦР, причем только с одним праймером ERIC-2. BOX-ПЦР имеет наименьшую дискриминирующую способность при типировании изолятов *P. aeruginosa*, устанавливая только видовые особенности. По результатам генотипирования, М.В. Кузнецова и соавт. [34] отметили сходство штаммов *P. aeruginosa* среди госпитализированных взрослых и подростков и выявления их в неонатальной клинике.

Заключение

Обзор публикаций продемонстрировал, что *S. aureus* и *S. Epidermidis* доминируют в этиологическом спектре возбудителей инфекционных процессов костной ткани. Участие данных микроорганизмов определяется целым спектром факторов патогенности. В патогенезе остеомиелита и прогрессировании заболевания главную роль играют токсины и гены лейкоцидин Пантона-Валентайна (PVL). Показано, что патогенные бактерии *Porphyromonas gingivalis* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* способны индуцировать дифференцированную продукцию цитокинов. Наибольшее внимание привлекает *E. faecium*, который проявляет мультирезистентность к широкому спектру антибиотиков. Доля инфекций, опосредованных *S. epidermidis*, *S. Saprophyticus* составляет, в среднем, порядка 25% случаев. Доля представителей грамотрицательной флоры *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* достигает 23% случаев. Патогенные нозокомиальные штаммы *P. aeruginosa* также вовлечены в формирование хронического воспаления при остеомиелите. По результатам опубликованных исследований, более трети случаев хронического остеомиелита опосредовано микробными ассоциациями, в составе которых доминируют *S. aureus*, *S. epidermidis* и реже *E. faecalis*.

Таким образом, применение ПЦР-анализа для идентификации возбудителей остеомиелита и амплификация генов с использованием специфичных праймеров имеет огромное преимущество перед рутинными микробиологическими тестами, являясь информативным методом исследования факторов патогенности основных возбудителей. Высокая значимость молекулярно-генетических методов исследований в изучении этиопатогенеза остеомиелита челюстей требует их широкого применения в клинике хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для успешного решения сложных задач по реабилитации пациентов с данным заболеванием.

Литература/References

1. Spyropoulou V., Dhoubi Chargui A., Merlini L., Samara E., Valaikaite R., Kampouroglou G. et al. Primary subacute hematogenous osteomyelitis in children: a clearer bacteriological etiology // *J Child Orthop.* – 2016;10(3):241-246. <https://doi.org/10.1007/s11832-016-0739-3>
2. Nishitani K., Sutipompalangkul W., de Mesy Bentley K.L., Varrone J.J., Bello-Irizarry S.N., Ito H. et al. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors // *J Orthop Res.* – 2015;33(9):1311-1319. <https://doi.org/10.1002/jor.22907>
3. Mariani B.D., Martin D.S., Chen A.F., Yagi H., Lin S.S., Tuan R.S. Polymerase Chain Reaction molecular diagnostic technology for monitoring chronic osteomyelitis // *J Exp Orthop.* – 2014;1(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40634-014-0009-6>
4. Ferroni A., Al Khoury H., Dana C., Quesne G., Berche P., Glorion C. et al. Prospective survey of acute osteoarticular infections in a French paediatric orthopedic surgery unit // *Clin Microbiol Infect.* – 2013;19(9):822-828. <https://doi.org/10.1111/clm.12031>
5. Qian J., Huang D., Fang M. A portable CRISPR Cas12a based lateral flow platform for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* with double insurance // *Food Control.* – 2022;132:108485. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108485>
6. Shibata S., Tanizaki R., Watanabe K., Makabe K., Shoda N., Kutsuna S. et al. *Escherichia coli* Vertebral Osteomyelitis Diagnosed According to Broad-range 16S rRNA Gene Polymerase Chain Reaction (PCR) // *Intern Med.* – 2015;54(24):3237-3240. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.54.5066>
7. Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Колодзиева В.В. Способ определения генотипов золотистого стафилококка. Патент РФ № 2526497 С2.2014. [А.Е. Гончаров, Л.П. Зуева, В.В. Колодзиева. Method for determination of *Staphylococcus aureus* genotypes. Patent RF № 2526497 S2. 2014. (In Russ.)]. https://www.elibrary.ru/download/elibrary_37803418_80472848.pdf
8. Szafranska A.K., Oxley A.P., Chaves-Moreno D., Horst S.A., Roßlenbroich S., Peters G. et al. High-resolution transcriptomic analysis of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* during acute and chronic phases of osteomyelitis // *mBio.* – 2014;5(6):e01775-e017714. <https://doi.org/10.1128/mBio.01775-14>
9. Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meunier H., Forey F. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease // *Infect Immun.* – 2002;70(2):631-641. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.631-641.2002>
10. Beekun K.E., Mrak L.N., Griffin L.M., Zielinska A.K., Shaw L.N., Rice K.C. et al. Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation // *PLoS One.* – 2010;5(5):e10790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010790>
11. Tristan A., Ying L., Bes M., Etienne J., Vandenesch F., Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections // *J Clin Microbiol.* – 2003;41(9):4465-4467. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4465-4467.2003>
12. Johansson A., Flock J.I., Svensson O. Collagen and fibronectin binding in experimental staphylococcal osteomyelitis // *Clin Orthop Relat Res.* – 2001;(382):241-246. <https://doi.org/10.1097/00003086-200101000-00032>
13. Que Y.A., François P., Haeffliger J.A., Entenza J.M., Vaudaux P., Moreillon P. Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis* // *Infect Immun.* – 2001;69(10):6296-6302. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6296-6302.2001>
14. Wiśniewska K., Piórkowska A., Kasprzyk J., Bronk M., Świec K. Clonal distribution of bone sialoprotein-binding protein gene among *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infections // *Folia Microbiol (Praha).* – 2014;59(6):465-471. <https://doi.org/10.1007/s12223-014-0321-7>
15. Wann E.R., Gurusiddappa S., Hook M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen // *J Biol Chem.* – 2000;275(18):13863-13871. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13863>
16. Vandenesch F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G.R., Heffernan H. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence // *Emerg Infect Dis.* – 2003;9(8):978-984. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030089>
17. Storz G., Vogel J., Wassarman K.M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers // *Mol Cell.* – 2011;43(6):880-891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
18. Palka-Santini M., Pützfeld S., Cleven B.E., Krönke M., Krut O. Rapid identification, virulence analysis and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* by gene segment-based DNA microarrays: application to blood culture post-processing // *J Microbiol Methods.* – 2007;68(3):468-477. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.004>
19. Duman Y., Sevimli R. Investigation of the presence of pantone-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthopedic surgical site infections // *Mikrobiyol Bul.* – 2018;52(4):340-347. <https://doi.org/10.5578/mb.67328>
20. Dubrac S., Msadek T. Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus* // *J Bacteriol.* – 2004;186(4):1175-1181. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1175-1181.2004>
21. Zhu X., Zhang K., Lu K., Shi T., Shen S., Chen X. et al. Inhibition of pyroptosis attenuates *Staphylococcus aureus*-induced bone injury in traumatic osteomyelitis // *Ann Transl Med.* – 2019;7(8):170. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.03.40>
22. Бухарин О.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Сычева М.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков. Журнал микробиологии. 2013;3:12-18. [O.V. Buharin, I.V. Valysheva, O.L. Kartashova, M.V. Sycheva. Characterization of the virulent potential of clinical isolates of enterococci. Journal of Microbiology. 2013(3):12-18. (In Russ.)]. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23140970>
23. Кузнецова М.В., Павлова Ю.А., Карпунина Т.И., Демаков В.А. Опыт использования методов молекулярной генетики при идентификации клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;3:34-37. [M.V. Kuznecova, Ju.A. Pavlova, T.I. Karpunina, V.A. Demakov. Experience of using molecular genetics methods in the identification of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical laboratory diagnostics. 2013(3):34-37. (In Russ.)]. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18923096>
24. Hadi Saleh T., Hashim S., Abdulrazaq Al-Obaidi R.A., Laftaah Al-Rubaii B.A. A biological study of chitinase produced by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of chia responsible gene // *Int J Res Pharm Sci.* – 2020;11(2):1539-1544. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i2.2030>
25. Tang Y., Ali Z., Jin G. Detection methods for: *Pseudomonas aeruginosa*: History and future perspective // *RSC Advances.* – 2017; 82(7): 51789-51800. <https://doi.org/10.1039/c7ra09064a>
26. De Vos D., Lim A. Jr., Pirnay J.P., Struelens M., Vandendaelde C., Duinslaeger L. et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprL and oprLL // *J Clin Microbiol.* – 1997;35(6):1295-1299. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1295-1299.1997>
27. Jami Al-Ahmadi G., Zahmatkesh Roodsari R. Fast and specific detection of *Pseudomonas Aeruginosa* from other *Pseudomonas* species by PCR // *Ann Burns Fire Disasters.* – 2016;29(4):264-267. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28289359>
28. Aghamollaei H., Moghaddam M.M., Kooshki H., Heiat M., Mirnejad R., Barzi N.S. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by a triplex polymerase chain reaction assay based on lasI/R and gyrB genes // *J Infect Public Health.* – 2015;8(4):314-322. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.03.003>
29. Khuntayaporn P., Yamprayoonswat W., Yasawong M., Chomnawang M.T. Dissemination of carbapenem-resistance among multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamase genes, including the novel blaIMP-65 gene in Thailand // *Infect Chemother.* – 2019;51(2):107-118. <https://doi.org/10.3947/ic.2019.51.2.107>
30. Naas T., Aubert D., Lambert T., Nordmann P. Complex genetic structures with repeated elements, a sul-type class 1 integron, and the bla_{VEB} extended-spectrum beta-lactamase gene // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2006;50(5):1745-1752. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1745-1752.2006>
31. Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S., Di Giovanni G.D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples // *Appl Environ Microbiol.* – 1998;64(7):2545-2553. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2545-2553.1998>
32. Мавзютов А.Р., Мирсаяпова И.А., Хасанова Г.Ф., Баймиев А.Х. Сравнительная оценка информативности методов этиологической диагностики внебольничной пневмонии. Клиническая лабораторная диагностика. 2012;12:35-38. [A.R. Mavzjutov, I.A. Mirsajapova, G.F. Hasanova, A.H. Bajmiev. Comparative assessment of the information content of methods for the etiological diagnosis of community-acquired pneumonia. Clinical laboratory diagnostics. 2012;12:35-38. (In Russ.)]. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=18762226>
33. Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13 // *J Bacteriol.* – 1989;171(5):2528-2532. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989>
34. Кузнецова М.В., Максимова А.В., Карпунина Т.И. Опыт использования Rep- и RAPD-полимеразной цепной реакции для эпидемиологической характеристики нозокомальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa*. Клиническая лабораторная диагностика. 2015;3:44-50. [M.V. Kuznecova, A.V. Maksimova, T.I. Karpunina. Experience of using Rep- and RAPD-polymerase chain reaction for epidemiological characterization of nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical laboratory diagnostics. 2015;3:44-50. (In Russ.)]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26031166>