

## ПЦР В ОБЛАСТИ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ: СУТЬ МЕТОДА И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Е.М. Полякова, С.А. Божкова

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России,  
директор – д.м.н. профессор Р.М. Тихилов  
Санкт-Петербург*

В обзоре кратко изложены сущность метода полимеразной цепной реакции и его наиболее распространенные варианты. Выделены три основных направления исследований в области травматологии и ортопедии, в основе которых лежит метод полимеразной цепной реакции: выявление возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции; выявление генов антибиотикорезистентности и генов биопленкообразования микробных возбудителей. Приведены примеры применения полимеразной цепной реакции для выявления значимых в травматологии и ортопедии наследственных заболеваний, а также в качестве дополнительного метода при исследованиях, связанных с процессами регенерации хрящевой и костной тканей.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, имплантат-ассоциированная инфекция, антибиотикорезистентность, биопленки.

## PCR IN TRAUMATOLOGY AND ORTHOPAEDICS: METHOD DESCRIPTION AND APPLICABILITY

E.M. Polyakova, S.A. Bozhkova

*Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopaedics,  
director – R.M. Tikhilov, MD Professor  
St. Petersburg*

Review brief presents description of polymerase chain reaction method (PCR) and its most common variants. Three PCR-based lines of research, carried out in the traumatology and orthopaedics, include identifying a causative agents of the implant-associated infection after orthopaedic surgery; detection of antibiotic resistance genes and biofilm forming genes. It was shown that PCR can be used as additional method for detection of genetic disorders, significant for traumatology and orthopaedics, and for investigation of cartilage and bone regeneration.

**Key words:** polymerase chain reaction, implant-associated infection, antibiotic resistance, biofilms.

Разнообразные методы молекулярной генетики на протяжении многих десятилетий успешно применяются и, непрерывно развиваясь, приобретают все большее распространение и значимость в различных областях науки и медицины. Одним из наиболее простых базовых методов является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Клиническая значимость метода ПЦР в основном сводится к диагностике инфекционных или наследственных заболеваний, в то время как в научных исследованиях ПЦР позволяет не только выявлять определенные гены или мутации, например, с целью оценки их распространенности в популяции, но и является обязательным этапом реализации более сложных и комплексных молекулярно-генетических подходов, необходимых для решения разнообразных научных задач.

Несмотря на то, что применение ПЦР в травматологии и ортопедии достаточно ограничено по сравнению с другими областями клинической медицины, тем не менее данный метод может быть полезен при решении целого ряда фундаментальных и прикладных проблем.

### Сущность и разновидности метода ПЦР

Сущность метода ПЦР заключается в многократном копировании участка ДНК, определяемого нуклеотидной последовательностью используемых олигонуклеотидов (праймеров). Необходимыми компонентами реакции являются ДНК-матрица (например, бактериальная ДНК), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, служащие строительными блоками для цепей ДНК, специфические праймеры (олигонуклеотиды, комплементарные участку ДНК-матрицы), фермент ДНК-полимераза, ионы  $MgCl^{2+}$  и реакционный буфер.

ПЦР включает несколько этапов: 1) денатурация ДНК; 2) отжиг праймеров; 3) элонгация (синтез новой цепи ДНК) (рис. 1).

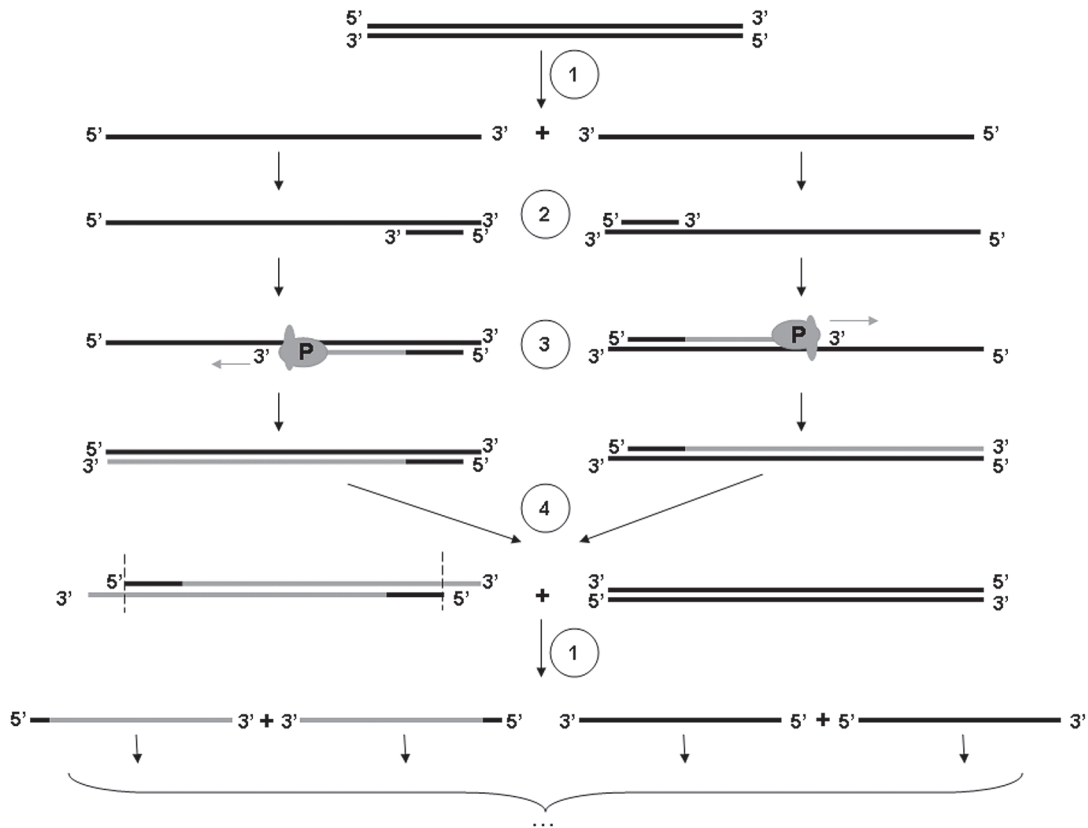
На этапе денатурации ДНК при температуре 94–98°C происходит расхождение цепей двухцепочечной ДНК-матрицы. После этого становится возможным второй этап реакции – отжиг праймеров, т.е. комплементарное присоединение специфического олигонуклеотида к одноцепочечной ДНК-матрице при определенной температуре, зависящей от нуклеотидной последовательности праймера. На этапе элонгации ДНК-полимераза, используя праймер в качестве затравки, синтезирует комплементарную цепь ДНК, достраивая одноцепочечную матрицу до двухцепочечной. На этом заканчивается первый цикл реакции. Обычная ПЦР включает в среднем 30 циклов, на каждом из которых происходит удвоение количества ДНК, полученного в результате предыдущего цикла. За счет такого многократного копирования достигается высокая чувствительность ПЦР: достаточно 10 молекул ДНК в пробе для их обнаружения.

Существует множество типов полимеразной цепной реакции, но для клиничко-диа-

гностических целей чаще всего применяют 2 варианта.

1. «Обычная» ПЦР (см. рис. 1): в результате такого типа ПЦР мы можем судить только о присутствии/отсутствии возбудителя, но не можем определить его количество. Кроме того, «обычная» ПЦР для детекции результата требует проведения электрофореза полученных продуктов амплификации, что увеличивает суммарное время анализа, а также повышает риск получения ложноположительных результатов из-за возможной контаминации проб продуктами амплификации.

2. ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР): при этом типе ПЦР применяют флуоресцентно-меченые праймеры, или ДНК-зонды, или интеркалирующие красители, что позволяет регистрировать результат по увеличению флуоресценции в течение всех циклов реакции. Таким образом, данный тип анализа имеет два существенных преимущества перед «обычной» ПЦР: детекция результата без проведения электрофореза, а следовательно, сокращение общего времени, затрачиваемого на анализ (на полчаса и более) и возможность получения количественного результата.



**Рис. 1.** Схематичное изображение первого цикла ПЦР: 1 – денатурация: 94–98°C; 2 – отжиг: температура отжига праймеров (например, 55°C); 3 – элонгация: 72°C (P – полимеразы); 4 – окончание первого цикла: исходные и синтезированные ДНК-цепи служат матрицей в следующем цикле реакции (количество матричной ДНК в ходе каждого последующего цикла удваивается)

К другим вариантам ПЦР, широко используемым в клинических исследованиях, относят мультиплексную и аллель-специфичную ПЦР.

**Мультиплексная ПЦР** при правильно подобранных условиях позволяет получить результат более одного анализа при проведении одной ПЦР-реакции за счет добавления нескольких пар специфических праймеров. Например, одна пара праймеров – для внутреннего контроля (на ДНК человека), а другая – для выявления возбудителя заболевания; или две и более пары праймеров для одновременного выявления нескольких возбудителей. Мультиплексная ПЦР может быть как обычной, т.е. требовать постановки электрофореза для детекции результата, так и в виде РВ-ПЦР.

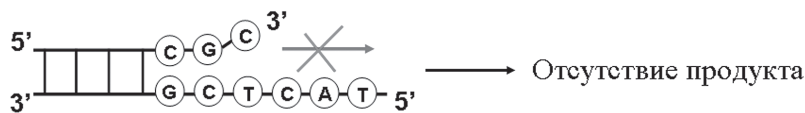
**Аллель-специфичная ПЦР** основана на том, что в случае, когда на 3'-конце праймера присутствует нуклеотид некомплементарный ДНК-матрице, эффективность удлинения праймера во время ПЦР резко снижается и может отсутствовать вовсе, а следовательно, продукт ПЦР образовываться не будет (рис. 2). Это свойство позволяет применять аллель-специфичную ПЦР для выявления точечных мутаций, присутствующих в интересующем гене.

травматологии и ортопедии, в основе которых лежит метод ПЦР: выявление возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции (ИАИ); выявление генов антибиотикорезистентности и генов биопленкообразования микробных возбудителей. Кроме того, возможно применение ПЦР для выявления наследственных заболеваний, имеющих значение в травматологии и ортопедии, а также в качестве дополнительного метода при исследованиях, связанных с процессами регенерации хрящевой и костной ткани.

**ПЦР как способ идентификации возбудителя при инфекциях костей и суставов**

Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя инфекции представляет значительный интерес прежде всего потому, что может позволить сократить время, необходимое для получения результата анализа (до 4 часов по сравнению с 1–7 сутками обычного бактериологического исследования), а следовательно, раньше определиться с лечебной тактикой, сократив тем самым время пребывания пациента в стационаре. Кроме того, ПЦР более чувствительна, чем обычное культивирование, что немаловажно при низкой бактериальной обсемененности образца.

**Дикий тип**



**Мутация**

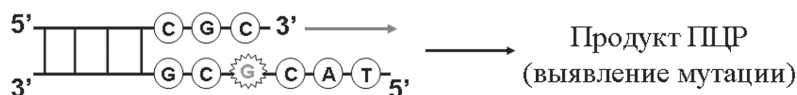


Рис. 2. Принцип работы аллель-специфичной ПЦР

Еще одной разновидностью метода ПЦР является ПЦР с обратной транскрипцией, применяемая для идентификации молекул РНК, например, в случае выявления РНК-содержащих вирусов или для доказательства экспрессии какого-либо гена на уровне транскрипции.

**Возможности применения ПЦР в области травматологии и ортопедии**

Проведенный анализ имеющихся литературных данных позволил выделить три основных направления научных исследований в области

Существенным ограничением применения ПЦР для выявления возбудителя инфекции в клинике является необходимость определения его антибиотикочувствительности на уровне фенотипа. Безусловно, одновременно с определением возбудителя методом ПЦР возможно и выявление присутствующих в его геноме генов антибиотикорезистентности. Но, к сожалению, само по себе наличие/отсутствие у возбудителя генов антибиотикорезистентности далеко не всегда коррелирует с его фенотипической устойчивостью/чувствительностью к антибиотикам.

При этом необходимость определять антибиотикочувствительность фенотипически, т.е. бактериологическими методами, влечет за собой потребность культивирования возбудителя: проведение бактериологического посева с одновременным или последующим определением антибиотикочувствительности, что практически сводит на нет смысл применения ПЦР для идентификации возбудителя инфекции.

Поэтому ПЦР необходимо рассматривать не как замену бактериологическому исследованию, а скорее как вспомогательный инструмент, который может стать полезным в ряде случаев. Так, например, отрицательный результат ПЦР-анализа дооперационного аспирата при подозрении на ИАИ у пациента с нестабильностью компонентов эндопротеза (ЭП) может ускорить принятие решения о проведении ревизионного эндопротезирования до получения результатов бактериологического исследования. В то же время при положительном результате ПЦР-анализа, например, выявлении метициллинорезистентного или метициллиночувствительного штамма *S. aureus* (MRSA или MSSA) и необходимости выполнить санлирующую операцию, антибиотикотерапия может быть назначена до фенотипического определения антибиотикочувствительности бактериологическими методами, поскольку существуют стандартные схемы антибактериальной терапии, рекомендованные для лечения ортопедических инфекций, вызванных MRSA или MSSA [5, 44]. Кроме того, ПЦР может быть полезна для выявления сложно- или некультивируемых микроорганизмов при клинической картине инфекции и отрицательных результатах бактериологических анализов.

Наиболее распространенными бактериальными возбудителями ИАИ в травматологии и ортопедии являются *S. aureus* и коагулазо-негативные стафилококки, а также разнообразные представители родов *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Propionibacterium spp.* и *Klebsiella spp* [2, 4, 17, 24, 41, 57]. Кроме того, за последние годы описаны редкие клинические случаи, при которых возбудителями ИАИ являются такие микроорганизмы, как *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis*, *Helcococcus kunzii*, *Arcanobacterium bernardiae*, *Gemella sanguinis*, *Coxiella burnetii* [16, 29, 33, 34, 47, 54, 60]. Не следует забывать, что ИАИ также может быть вызвана небактериальными возбудителями, например грибами рода *Candida spp.*, в основном *C. albicans*, а также *C. krusei* и *C. tropicalis* [24; 48]. Очевидно, что спектр микроорганизмов-возбудителей ИАИ достаточно широк, поэтому охватить все имеющееся биоразнообразие при помощи постановки ПЦР на каждый отдельный вид бак-

терии или гриба достаточно дорого и трудоемко. Тем не менее, существует значительное число исследований, посвященных данной проблеме. По сути, все они сводятся к двум основным подходам ПЦР-диагностики ИАИ в травматологии и ортопедии:

- ПЦР с использованием видо- или родоспецифичных праймеров (специфичная ПЦР);
- ПЦР широкого спектра («broad range» ПЦР).

Каждый из этих подходов имеет свои достоинства, недостатки и методические проблемы, которые вкратце будут рассмотрены далее.

*ПЦР с видо- или родоспецифичными праймерами.* Общая схема проведения ПЦР-анализа с использованием видо- или родоспецифичных праймеров представлена на рисунке 3 а.

Большая часть исследований по применению специфичной ПЦР при ИАИ посвящена выявлению *S. aureus*, как наиболее частого возбудителя, а также выявлению гена *tecA*, являющегося молекулярно-генетическим маркером метициллинорезистентности [8, 53]. При этом в качестве гена-мишени для идентификации *S. aureus* чаще всего используют гены *nuc*, *femA*, видоспецифичные участки гена 16S рРНК и др. Описаны условия для выявления данных генов как при помощи обычной ПЦР, так и при помощи РВ-ПЦР [36, 38]. Известны публикации, посвященные разработке мультиплексных ПЦР, позволяющих выявлять не только конкретный вид микроорганизма возбудителя, но и ряд других генетических детерминант. Например, в исследовании Hassanain Al-Talib с соавторами предложена пентаплексная ПЦР, при помощи которой возможно выявление микроорганизмов рода *Staphylococcus* (выявление специфичного участка гена 16S рРНК), метициллинорезистентности *S. aureus* (гены *femA* и *tecA*), гена токсина PVL (*lukS*), а также гена внутреннего контроля (ген *hemM*) [11].

Проведены исследования по ПЦР-идентификации других родов микроорганизмов-возбудителей ИАИ. Например, в публикации Charles Cazanave с соавторами представлена мультиплексная ПЦР для выявления наиболее распространенных патогенных для человека представителей рода *Corynebacterium*, вызывающих ИАИ (*C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. jeikeium*, *C. striatum* и *C. tuberculostearicum*) [17]. А в работе Robert J. Clifford с соавторами протестировано несколько пар праймеров для выявления каждого из следующих патогенов: *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosae* и *K. pneumoniae* на 200 клинических образцах каждого вида. Эффективность работы праймеров составила от 93,8 до 99,1% [21].

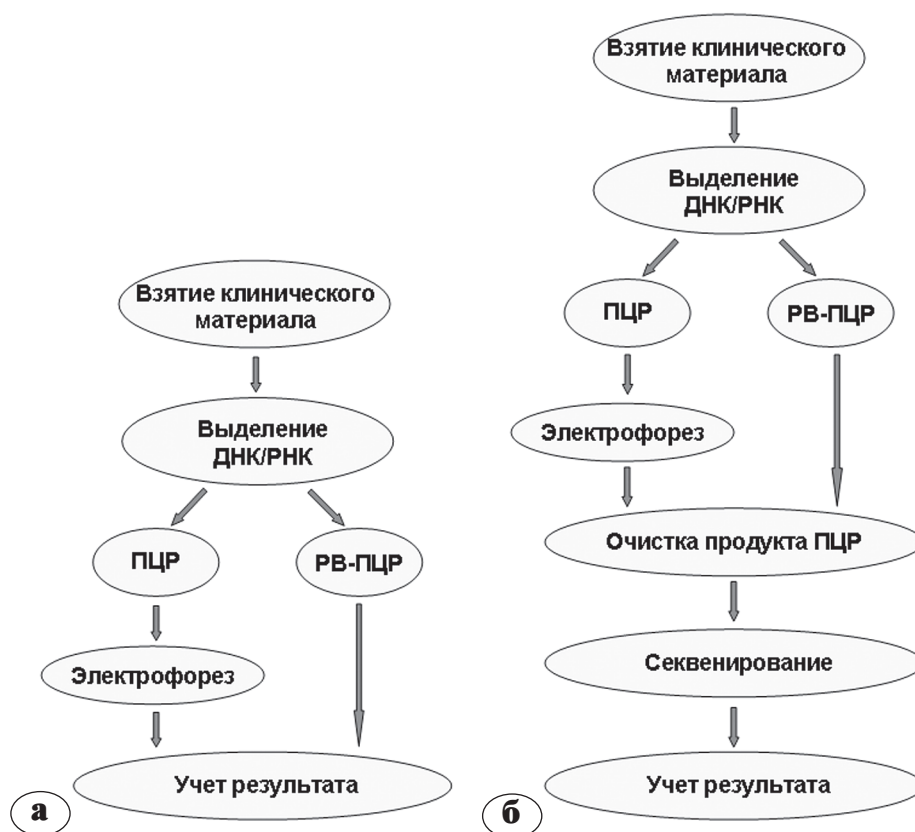


Рис. 3. Схема проведения клинического анализа: а – с применением метода специфичной ПЦР; б – с применением ПЦР широкого спектра

Существуют исследования, посвященные выявлению при помощи ПЦР редких патогенов, а также применению в клинике коммерческого набора SeptiFast® фирмы Roche [9], позволяющего на основе ПЦР выявлять основные возбудители сепсиса. Данный набор может послужить прототипом для разработки тест-систем по идентификации родов микроорганизмов, наиболее частых возбудителей ИАИ, что сделало бы более целесообразным применение специфичной ПЦР в целях диагностики инфекций в клинике травматологии и ортопедии.

*ПЦР широкого спектра («broad range» ПЦР, универсальная ПЦР).* ПЦР широкого спектра представляет собой ПЦР или РВ-ПЦР, чаще всего с использованием праймеров на гены 16S рРНК, 23S рРНК или межгенные участки рРНК с последующей очисткой образовавшегося ПЦР-продукта, его секвенированием и анализом полученной нуклеотидной последовательности с целью определения видовой принадлежности возбудителя (рис. 3 б) [40, 42].

Ген 16S рРНК присутствует во множестве копий в геномах всех патогенов человека, относящихся к домену *Eubacteria* [23]. Многие виды бактерий содержат до семи копий данного гена

[15], что повышает вероятность обнаружения малых количеств патогенов (низкая обсемененность) по сравнению с применением другой генной мишени, присутствующей в геноме в единственном числе. Согласно данным секвенирования, последовательность гена 16S рРНК консервативна среди представителей домена *Eubacteria*, но при этом обладает вариабельностью, обеспечивающей видоспецифичные отличия [49]. Поэтому для получения информации о присутствии ДНК всех бактериальных возбудителей в одном клиническом образце достаточно проведения одной ПЦР, последующего секвенирования и анализа нуклеотидной последовательности.

Учитывая, что ПЦР способна  $10^6$ - $10^7$ -кратно амплифицировать единичную копию ДНК-матрицы, проблемой становится даже незначительная контаминация реакционной смеси экзогенной ДНК. Поэтому проведение универсальной ПЦР широкого спектра может быть затруднено контаминацией ПЦР-реагентов, в особенности реагентов, полученных из бактериальных источников. Например, Taq-ДНК-полимераза, в настоящее время получаемая в виде рекомбинантного белка из *E. coli*, может содержать

примеси бактериальной ДНК, которые приведут к ложноотрицательному результату. Некоторые исследователи пытаются решить проблему изначальной контаминации ПЦР-реагентов при помощи дополнительной физической, химической или ферментативной обработки Таq-полимеразы [26, 28, 50]. Но, несмотря на положительное действие подобной обработки, полностью исключить влияние контаминирующей ДНК не удалось. Более того, в случае обработки УФ было отмечено снижение активности Таq-полимеразы [23]. В качестве альтернативы ряд авторов предлагает специальный дизайн праймеров, который позволяет избежать амплификации контаминирующей ДНК [18], но данный подход еще недостаточно апробирован, к тому же предполагает использование дополнительной полимеразы (фрагмент Кленова). Таким образом, до успешного развития производства ультрачистых компонентов ПЦР-смеси применение ПЦР широкого спектра остается затруднительным.

#### **ПЦР-диагностика антибиотикорезистентности у возбудителей ИАИ**

Термин «антибиотикорезистентность» подразумевает устойчивость микроорганизмов к антибиотикам – веществам природного или полусинтетического происхождения, подавляющим рост живых клеток, в том числе бактериальных. С биологической точки зрения, существует два типа антибиотикорезистентности: природная и приобретенная. В основе природной антибиотикорезистентности лежит отсутствие у микроорганизма мишени воздействия антибиотика (например, отсутствие у микоплазм пептидогликана, в результате чего они не чувствительны к воздействию бета-лактамовых антибиотиков). В основе приобретенной – приобретение новых генетических детерминант резистентности, кодирующих ферменты, инактивирующие антибиотики или защитные белки, модифицирующие мишень воздействия антибиотика. Приобретенная антибиотикорезистентность также может быть обусловлена модификацией собственного генома, наиболее распространенным механизмом которой является возникновение мутаций в генах, кодирующих мишени антибиотиков, а также клеточные системы, ответственные за выведение антибиотика из клетки микроорганизма (например, система эффлюкса и пориновые каналы). Молекулярные механизмы резистентности к основным группам антибиотиков были детально описаны ранее [6, 7].

Примером устойчивости штаммов к антибактериальным препаратам за счет приобретения новых генетических детерминант может служить приобретение *S. aureus* гена *tesA*, присутствие которого обуславливает устойчивость не только к метициллину, но и к другим бета-лактамам антибиотикам. При этом во многих исследова-

ниях показана практически 100% корреляция между устойчивостью штаммов к бета-лактамам, определенной бактериологическими методами и методами на основе ПЦР [27, 31]. Технически выявление гена *tesA* и подобных ему новых генетических детерминант, например, генов устойчивости к ванкомицину (гены *van*) и генов устойчивости к тетрациклину (*tetM*, *tetK*), является достаточно простым и сводится к корректному подбору последовательности праймеров, учитывающей максимально возможное число аллелей гена антибиотикорезистентности, известных в настоящее время и доступных в базах данных нуклеотидных последовательностей.

Среди механизмов устойчивости, обусловленной модификацией собственного генома, известна устойчивость штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий к фторхинолонам, сформировавшаяся в результате возникновения мутаций в генах, кодирующих ферменты, участвующие в процессе репликации ДНК бактерии: гены *gyrA* и *gyrB* (ДНК-гираза), а также гены *parC*, *parE* (топоизомераза IV) [10]. Аналогичный механизм устойчивости описан для *S. aureus* в отношении рифампицина (мутация в гене *rpoB*, кодирующем РНК-зависимую ДНК-полимеразу) и линезолида (мутация гена 23S рРНК и генов *rplC*, *rplD* и *rplV*, кодирующих рибосомальные белки) [32, 35, 51]. Выявление подобной устойчивости может быть проведено при помощи обычной ПЦР с последующими очисткой, секвенированием и анализом нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта или при помощи мультиплексной аллель-специфичной ПЦР, позволяющей за одну реакцию выявить наличие гена и определить присутствие в нем мутации без временных и денежных затрат на очистку, секвенирование и анализ последовательности продукта, полученного в результате обычной ПЦР.

С клинической точки зрения, на вопрос о практической значимости выявления генов антибиотикорезистентности у возбудителей ИАИ в настоящий момент сложно ответить однозначно, т.к. выбор антибактериальной терапии должен прежде всего основываться на данных о фенотипической чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам, т.е. на данных бактериологических методов анализа. В то время как применение метода ПЦР может дать информацию только о присутствии тех или иных генетических детерминант устойчивости (генов или мутаций). Таким образом, выявление гена или мутации устойчивости даст информацию не о том, какой антибактериальный препарат будет активен в отношении данного микроорганизма, а о том, какой препарат применять не следует из-за его неэффективности. При этом не исключены ситуации, когда:

– генетические детерминанты устойчивости к определенному антибиотику не выявлены, а микроорганизм все равно устойчив (например, за счет присутствия мутаций или генов устойчивости, не описанных для него ранее);

– генетические детерминанты выявлены, но микроорганизм чувствителен к антибиотику (например, ген устойчивости присутствует, но вследствие нарушения посттранскрипционных процессов синтеза кодируемый им белок является неактивным, и, следовательно, не может обеспечить устойчивость).

В этой связи могут возникнуть трудности с однозначной трактовкой полученных результатов генетического анализа, а следовательно, и выбора метода лечения. Исключения для ПЦР-диагностики антибиотикорезистентности могут составлять случаи выявления генетических детерминант, присутствие которых по данным научных исследований и собственному опыту применения в клинике высоко, если не на 100%, коррелирует с фенотипической устойчивостью. К таким детерминантам можно отнести уже упомянутый ген *tesA*, на основе которого созданы наборы для ПЦР-диагностики устойчивости *S. aureus* к цефалоспорином [12], а также гены устойчивости к ванкомицину, выявление которых позволяет идентифицировать ванкомицинорезистентные штаммы бактерий рода *Enterococcus spp.* [56]. Хорошие результаты также были показаны для штаммов *M. tuberculosis*, устойчивость которых к рифампицину на 93% коррелировала с наличием определенной мутации в гене *rpoB* [46].

Таким образом, в ряде случаев применение ПЦР для определения антибиотикорезистентности микроорганизмов может дать выигрыш по времени при назначении лечения 1–2 дня, т.к. определение антибиотикочувствительности часто требует дополнительных суток инкубирования уже после идентификации возбудителя. А в случае со смешанной культурой различных микроорганизмов (до 3–4 микроорганизмов с одного биоптата) может потребоваться двое суток для их разделения и оценки чувствительности к антибиотикам.

Кроме того, мониторинг распространенности известных генов и отдельных мутаций, обуславливающих антибиотикорезистентность микроорганизмов, имеет большую научную и эпидемиологическую значимость.

### **Выявление генов биопленкообразования у возбудителей ИАИ**

Микробная биопленка представляет собой прикрепленное к поверхности структурированное сообщество микроорганизмов, включающее в свой состав как функционально активные, так и покоящиеся бактериальные клетки, погруженные в экзополисахаридный матрикс [1]. Микробные

биопленки могут образовываться на различных субстратах как биотических, например ткани и органы человека, так и абиотических, например изделиях медицинского назначения, включая катетеры и имплантаты, изготовленные из различных материалов [45].

Установлено, что микроорганизмы в составе биопленок более устойчивы к воздействию иммунной системы организма человека и антимикробных препаратов [30], поэтому лечение традиционными концентрациями антимикробных веществ может оказаться неэффективным для их эрадикации.

Ввиду подобной устойчивости микробные биопленки имеют большую клиническую значимость как при лечении пациента в текущий момент времени, так и в отдаленной перспективе, особенно в случае эндопротезирования суставов, поскольку искусственные суставы – это одна из наиболее уязвимых групп имплантатов, для которой риск в отношении развития или рецидива инфекции сохраняется пожизненно. Поэтому современные исследования хирургических инфекций много внимания уделяют проблеме образования микробных биопленок непосредственно на тканях человека в области хирургического вмешательства и на изделиях медицинского назначения [24, 39].

Вкратце процесс образования биопленки включает следующие этапы:

- 1) адгезия бактериальных клеток к субстрату;
- 2) созревание биопленки: пролиферация клеток, образование экзополисахаридного матрикса и формирование трехмерной структуры биопленки.

Стоит отметить, что все бактерии способны формировать биопленки, однако известно, что разные штаммы одного и того же вида обладают различной способностью к биопленкообразованию при культивировании в одних и тех же условиях [3, 19]. Это не удивительно, поскольку в основе способности штамма к образованию биопленки, как и в основе всех фенотипических свойств, лежит совокупность генов данного микроорганизма, кодирующих большое число продуктов, непосредственно задействованных в процессе формирования биопленки, а также различные факторы, участвующие в регуляции не только процесса биопленкообразования, но и других метаболических путей бактерии.

Так, для *S. aureus* описано множество генов, продукты которых (в основном белковой природы) опосредуют адгезию микроорганизмов друг к другу (*pia*, *sasG*), к костному сиалопротеину (*bbp*) и к компонентам внеклеточного матрикса человека, таким как фибронектин (*finbA* и *finbB*), фибриноген (*fib*, *clfB*), коллаген (*cna*), эластин (*ebpS*) и ламинин (*eno*) [14, 22].

Показано участие в синтезе экзополисахаридного матрикса генов локуса *ica* (*icaA*, *icaD*, *icaB* и *icaC*) [25, 37]. В то же время был описан *ica*-независимый механизм образования биопленки, а следовательно, гены, необходимые для синтеза бактериального экзополисахарида, не так важны для формирования биопленки, как предполагалось ранее [55].

Известно, что процесс созревания биопленки регулируется системами «*quorum sensing*», позволяющими бактериям координировать свое поведение в ответ на изменение условий среды за счет продукции низкомолекулярных соединений, способных в определенных концентрациях активировать транскрипцию ряда генов, в том числе генов биопленкообразования и генов вирулентности. Данные системы подробно описаны у многих бактерий. Так, для *S. aureus* описана система *Agr*, кодируемая генетическим локусом *agrABCD*, для *P. aeruginosa* – системы *LasRI*, *RhIR*, *LasRI* и *PQS*, для *E. coli* – система *QseBC* и *AI-2*-опосредованная система [13]. Молекулярные механизмы работы данных систем и гены, лежащие в их основе, детально описаны ранее [6, 13].

Однако данные исследования имеют чисто научное значение без возможности практического применения в клинике, поскольку в настоящее время существенной корреляции между присутствием в геноме бактерии определенного гена/генов и способностью штамма к образованию биопленки не выявлено. Но, несмотря на это по-прежнему актуальными остаются два основных направления исследований, связанных с изучением генетических аспектов процесса биопленкообразования:

1) выявление паттерна генов, характеризующего штамм возбудителя ИАИ как сильного биопленкообразователя с целью последующей корректировки проводимой антибиотикотерапии или применения альтернативных способов эрадикации биопленки;

2) поиск мишеней, в том числе генетических, для воздействия различными активными агентами, предотвращающими процесс биопленкообразования, в частности за счет воздействия на регуляторные системы бактериальной клетки.

При этом метод ПЦР в том или ином виде необходим для проведения исследований по обоим упомянутым направлениям.

#### **ПЦР как дополнительный способ диагностики и научных исследований**

Являясь одним из основных и простых методов молекулярной генетики, ПЦР находит широкое применение в качестве дополнительного способа при проведении диагностики и научных исследований в травматологии и ортопедии и смежных с ней областях.

Так, известно применение ПЦР как одного из комплекса инструментальных и лабораторных методов диагностики несовершенного остеогенеза – генетического нарушения, развивающегося в результате возникновения мутаций в генах, участвующих в синтезе коллагена 1-го типа (*COL1A1* и *COL1A2*), а также в генах *CRTAP* (*cartilage-associated protein*) и *LEPRE1* (*prolyl-3-hydroxylase 1*), что приводит к недостаточному синтезу коллагена 1-го типа или его аномальному строению и, в конечном итоге, к повышенной ломкости костей у пациента [58]. Диагностика несовершенного остеогенеза, помимо оценки клинической картины (множественные переломы), биохимического анализа коллагена, рентгенологических исследований и денситометрии костей, включает скрининг определенных генов на наличие мутаций, приводящих к развитию данного заболевания. Скрининг генов осуществляют при помощи различных способов, в том числе секвенирования и денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии [58]. Однако одним из необходимых подготовительных этапов данных способов является проведение ПЦР.

Еще одним патологическим состоянием, которое может иметь значение для травматологии и ортопедии, является развитие тромбоза глубоких вен после больших ортопедических операций. На основании целого ряда мутаций, ассоциированных с высоким риском тромбообразования, разработаны и успешно применяются в различных областях медицины диагностические наборы на основе ПЦР для выявления предрасположенности человека к тромбозам [52]. Но в настоящее время проведение подобной ПЦР-диагностики перед ортопедическими операциями не имеет клинической значимости, поскольку всем пациентам с высоким риском развития тромбоза (большая операция, пожилой возраст, избыточный вес, тромбоз глубоких вен в анамнезе) проводят тромбопрофилактику с назначением антикоагулянтов вне зависимости от генетического профиля пациентов.

В отношении научных исследований в области травматологии и ортопедии значительный интерес представляет применение ПЦР как способа доказательства успешной регенерации хряща при проведении хондропластики. Так, в работе Masashi Yokota с соавторами при помощи РВ-ПЦР с обратной транскрипцией были выявлены молекулы РНК коллагена 2-го типа, аггрекана и *SOX9*, служащие маркерами процесса хондрогенеза [59]. Аналогично в работе R.S. Nirmal и P.D. Nair выявление этих же РНК-маркеров свидетельствовало о дифференциации мезенхимальных стволовых клеток в хондроциты под действием *TGF-β3* и *BMP-2* [43]. Также ПЦР необходима при молекулярных исследованиях регуляторных процессов и механизмов



развития как хрящевой, так и костной ткани, например, при изучении регуляторных функций остеогенного белка OP-1 в хондроцитах [20].

### Заключение

Таким образом, очевидно, что корректное использование метода ПЦР может быть полезно и оправдано не только при проведении разнообразных научных исследований в области травматологии и ортопедии, но и в клинической практике в качестве способа лабораторной диагностики.

### Литература

- Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биопленки ран: состоянии вопроса. Травматология и ортопедия России. 2011; 3(61): 119-125.  
*Afinogenova A.G., Darovskaya E.N. Mikrobnye bioplenki ran: sostoyanie voprosa [Microbial biofilms wounds: state of the problem]. Travmatologiya i Ortopediya Rossii. 2011; 3(61): 119-125.*
- Божкова С.А., Афиногенов Г.Е., Разоренов В.Л., Петрова Т.М. Мониторинг микробного пейзажа в отделении гнойной хирургии — основа для разработки рациональной антибактериальной терапии. Клинико-лабораторный консилиум. 2009; (3): 50-56.  
*Bozhkova S.A., Afinogenov G.E., Razoryonov V.L., Petrova T.M. Monitoring mikrobnogo peizazha v otdelenii gnoinoi khirurgii — osnova dlya razrabotki racionalnoi antibakterialnoi terapii [Microbial picture monitoring in department of purulent surgery as a base of rational antibacterial therapy]. Kliniko-laboratornii konsilium. 2009; (3): 50-56.*
- Божкова С.А., Краснова М.В., Полякова Е.М., Рукина А.Н., Шабанова В.В. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* — ведущих возбудителей имплант-ассоциированной инфекции Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 16(2): 149-156.  
*Bozhkova S.A., Krasnova M.V., Polyakova E.M., Rukina A.N., Shabanova V.V. Sposobnost k formirovaniu bioplenok u klinicheskikh shtammov S. aureus i S. epidermidis — vedushchikh vozбудitelei implant-associirovannoi infekcii [Biofilm Formation by Clinical Isolates of S. aureus and S. epidermidis in Prosthetic Joint Infection]. Klinicheskaya mikroboiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2014; 16(2): 149-156.*
- Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Рукина А.Н. Ортопедическая имплантат-ассоциированная инфекция: ведущие возбудители, локальная резистентность и рекомендация по антибактериальной терапии. Травматология и ортопедия России. 2013; 4(70): 5-15.  
*Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Krasnova M.V., Rukina A.N. Ortopedicheskaya implantat-associirovannaya infekciya: vedushshie vozбудiteli, lokalnaya rezistentnost i rekomandaciya po antibakterialnoi terapii [Orthopedic implant-associated infection: the main etiological agents, local resistance and antimicrobial therapy recommendations]. Travmatologiya i ortopedia Rossii. 2013; 4(70): 5-15.*
- Божкова С.А., Тихилов Р.М., Разоренов В.Л., Чуприс В.Г., Петрова Т.М. Микробиологические аспекты антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными возбудителями. Инфекции в хирургии. 2011; 9(3): 31-36.  
*Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Razoryonov V.L., Chupris V.G., Petrova T.M. Mikrobiologicheskie aspekti antibakterialnoi terapii paraproteznoi infekcii vizvannoi grampologhitelnimi vozбудitelyami [Microbiological aspects of antibiotic therapy paraproteznoy infection caused by Gram-positive pathogens]. Infekcii v khirurgii. 2011; 9(3): 31-36.*
- Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. СПб: Санкт-Петербургский университет; 2007. 209 с.  
*Ermilova E.V. Molekulyarnie aspekti adaptacii prokariot [Molecular aspects of adaptation of prokaryotes]. SPb: Sankt-Peterburgskii universitet; 2007. 209 s.*
- Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам [The molecular basis of antibiotic resistance]. Успехи биологической химии. 2004; 44: 263-306.  
*Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molekulyarnie osnovi rezistentnosti k antibiotikam. Uspekhi biologicheskoi khimii. 2004; 44: 263-306.*
- Abimanyu N., Krishnan A., Murugesan S., Subramanian G.K., Gurumurthy S., Krishnan P. Use of Triplex PCR for Rapid Detection of PVL and Differentiation of MRSA from Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci. J. Clin. Diagn. Res. 2013; 7(2): 215-218.
- Achermann Y., Vogt M., Leunig M., W st J., Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(4): 1208-1214.
- Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. Biochemistry. 2014; 53(10): 1565-1574.
- Al-Talib H., Yean C.Y., Al-Khateeb A., Hassan H., Singh K.K., Al-Jashamy K., Ravichandran M. A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Panton-Valentine Leucocidin. BMC Microbiol. 2009; 9: 113.
- Anand K.B., Agrawal P., Kumar S., Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. Indian J. Med. Microbiol. 2009; 27(1): 27-29.
- Antunes L.C., Ferreira R.B., Buckner M.M., Finlay B.B. Quorum sensing in bacterial virulence. Microbiology. 2010; 156: 2271-2282.
- Atshan S.S., Nor Shamsudin M., Sekawi Z., Lung L.T., Hamat R.A., Karunanidhi A., Mateg Ali A., Ghaznavi-Rad E., Ghasemzadeh-Moghaddam H., Chong Seng J.S., Nathan J.J., Pei C.P. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of Staphylococcus aureus. J. Biomed. Biotechnol. 2012; 2012: 976-972.
- Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., Noller H.F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 1981; 148(2): 107-127.
- Carrega G., Bartolacci V., Burastero G., Finocchio G.C., Ronca A., Riccio G. Prosthetic joint infections due to Mycobacterium tuberculosis: A report of 5 cases. Int. J. Surg. Case Rep. 2013; 4(2): 178-181.

17. Cazanave C., Greenwood-Quaintance K.E., Hanssen A.D., Patel R. Corynebacterium prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(5): 1518-1523.
18. Chang S.S., Hsu H.L., Cheng J.C., Tseng C.P. An efficient strategy for broad-range detection of low abundance bacteria without DNA decontamination of PCR reagents. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20303.
19. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H.J. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Clin. Microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006.
20. Chubinskaya S., Otten L., Soeder S., Borgia J.A., Aigner T., Rueger D.C., Loeser R.F. Regulation of chondrocyte gene expression by osteogenic protein-1. *Arthritis Res. Ther.* 2011; 13(2): R55.
21. Clifford R.J., Milillo M., Prestwood J., Quintero R., Zurawski D.V., Kwak Y.I., Waterman P.E., Lesho E.P., Mc Gann P. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48558.
22. Corrigan R.M., Miajlovic H., Foster T.J. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 22.
23. Corless C.E., Guiver M., Borrow R., Edwards-Jones V., Kaczmarek E.B., Fox A.J. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(5): 1747-1752.
24. Fernandes A., Dias M. The Microbiological profiles of infected prosthetic implants with an emphasis on the organisms which form biofilms. *J. Clin. Diagn. Res.* 2013; 7(2): 219-223.
25. Fluckiger U., Ulrich M., Steinhuber A., Döring G., Mack D., Landmann R., Goerke C., Wolz C. Biofilm formation, *icaADBC* transcription, and polysaccharide intercellular nfluenz synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infect. Immun.* 2005; 73(3): 1811-1819.
26. Frothingham R., Blitchington R.B., Lee D.H., Greene R.C. and Wilson K.H. UV absorption complicates PCR decontamination. *Biotechniques.* 1992; 13(2): 208 – 210.
27. Grisold A.J., Leitner E., Mühlbauer G., Marth E., Kessler H.H. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2392-2397.
28. Hilali F., Saulnier P., Chachaty E., Andremont A. Decontamination of polymerase chain reaction reagents for detection of low concentration of 16S rRNA genes. *Mol. Biotechnol.* 1997; 7: 207 – 216.
29. Hoarau G., Bernard S., Pavese P., Saragaglia D., Croize J., Maurin M. *Gardnerella vaginalis* as a rare cause of prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(12): 4154-4156.
30. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 35(4): 322-332.
31. Huh H.J., Kim E.S., Chae S.L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal surveillance swabs at an intensive care unit: an evaluation of the LightCycler MRSA advanced test. *Ann. Lab. Med.* 2012; 32(6): 407-412.
32. Jansen van Rensburg M.J., Whitelaw A.C., Elisha B.G. Genetic basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* suggests clonal expansion in hospitals in Cape Town, South Africa. *BMC Microbiol.* 2012; 12:46.
33. Leung D.T., Davis E.M., Qian Q., Gold H.S. First report of prosthetic joint infection by *Gemella sanguinis* and associated "pseudosatelliting" phenomenon on culture. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(9): 3395-3397.
34. Loïez C., Tavani F., Wallet F., Flahaut B., Senneville E., Girard J., Courcol R.J. An unusual case of prosthetic joint infection due to *Arcanobacterium bernardiae*. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt 6): 842-843.
35. Long K.S., Vester B. Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(2): 603-612.
36. Kwon S.J., Jeon T., Seo D., Na M., Choi E.G., Son J.W., Yoo E.H., Park C.G., Lee H.Y., Kim J.O., Kim S.Y., Kang J. Quantitative PCR for Etiologic Diagnosis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia in Intensive Care Unit. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul).* 2012; 72(3): 293-301.
37. Mack D., Rohde H., Dobinsky S., Riedewald J., Nedelmann M., Knobloch J.K., Elsner H.A., Feucht H.H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular nfluenz and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2000; 68(7): 3799-3807.
38. Madhava Charyulu E., Gnanamani A., Mandal A.B. Identification and Discrimination of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Burn Wound Sites Using PCR and Authentication with MALDI-TOF-MS. *Indian J. Microbiol.* 2012; 52(3): 337-345.
39. Makino T., Jimi S., Oyama T., Nakano Y., Hamamoto K., Mamishin K., Yahiro T., Hara S., Takata T., Ohjimi H. Infection mechanism of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* on indwelling foreign materials in mice. *Int. Wound J.* 2013.
40. Marín M., Garcia-Lechuz J.M., Alonso P., Villanueva M., Alcalá L., Gimeno M., Cercenado E., Sánchez-Somolinos M., Radice C., Bouza E. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 583-589.
41. Martínez-Pastor J.C., Maculé-Beneyto F., Suso-Vergara S. Acute infection in total knee arthroplasty: diagnosis and treatment. *Open Orthop. J.* 2013; 7: 197-204.
42. Millar B.C., Xu J., Moore J.E. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2007; 9(1): 21-39.
43. Nirmal R.S., Nair P.D. Significance of soluble growth factors in the chondrogenic response of human umbilical cord matrix stem cells in a porous three dimensional scaffold. *Eur. Cell Mater.* 2013; 26: 234-251.
44. Osmon D.R., Berbari E.F., Berendt A.R., Lew D., Zimmerli W., Steckelberg J.M., Rao N., Hanssen A., Wilson W.R.; Infectious Diseases Society of America Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56(1): e1-e25.
45. Pace John L., Rupp Mark E., Finch Roger G. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy.* New York: Taylor & Francis Group; 2006. 512 p.

46. Park H., Song E.J., Song E.S., Lee E.Y., Kim C.M., Jeong S.H., Shin J.H., Jeong J., Kim S., Park Y.K., Bai G.H., Chang C.L. Comparison of a conventional antimicrobial susceptibility assay to an oligonucleotide chip system for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(5): 1619-1624.
47. Pérez-Jorge C., Cordero J., Marin M., Esteban J. Prosthetic joint infection caused by *Helicobacterium* *kunzii*. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(2): 528-530.
48. Phelan D.M., Osmon D.R., Keating M.R., Hanssen A.D. Delayed reimplantation arthroplasty for candidal prosthetic joint infection: a report of 4 cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34(7): 930-938.
49. Rådström P., Bäckman A., Qian N., Kragstbjerg P., Pålsson C., Olcén P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and streptococci using a seminested PCR strategy. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(11): 2738-2744.
50. Rochelle P.A., Weightman A.J., Fry J.C. DNase I treatment of Taq DNA polymerase for complete PCR decontamination. *Biotechniques.* 1992; 13: 520.
51. Sierra J.M., Camoez M., Tubau F., Gasch O., Pujol M., Martin R., Domínguez M.A. Low prevalence of Cfr-mediated linezolid resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Spanish hospital: case report on linezolid resistance acquired during linezolid therapy. *PLoS One.* 2013; 8(3): e59215.
52. Slavik L., Krcova V., Hlusi A., Prochazkova J., Prochazka M., Ulehlova J., Indrak K. Biomed Pap Med Molecular pathophysiology of thrombotic states and their impact to laboratory diagnostics. *Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.* 2009; 153(1): 19-25.
53. Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *Ger. Med. Sci.* 2009; 7: Doc06.
54. Tande A.J., Cunningham S.A., Raoult D., Sim F.H., Berbari E.F., Patel R. A case of Q fever prosthetic joint infection and description of an assay for detection of *Coxiella burnetii*. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1): 66-69.
55. Toledo-Arana A., Merino N., Vergara-Irigaray M., Débarbouillé M., Penadés J.R., Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system. *J. Bacteriol.* 2005; 187(15): 5318-5329.
56. Tripathi A., Shukla S.K., Singh A., Prasad K.N. A new approach of real time polymerase chain reaction in detection of vancomycin-resistant enterococci and its comparison with other methods. *Indian J. Med. Microbiol.* 2013; 31(1): 47-52.
57. Tseng S.W., Chi C.Y., Chou C.H., Wang Y.J., Liao C.H., Ho C.M., Lin P.C., Ho M.W., Wang J.H. Eight years experience in treatment of prosthetic joint infections at a teaching hospital in Central Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2012; 45(5): 363-369.
58. van Dijk F.S., Byers P.H., Dalgleish R., Malfait F., Maugeri A., Rohrbach M., Symoens S., Sistermans E.A., Pals G. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012; 20(1): 11-19.
59. Yokota M., Yasuda K., Kitamura N., Arakaki K., Onodera S., Kurokawa T., Gong J.P. Spontaneous hyaline cartilage regeneration can be induced in an osteochondral defect created in the femoral condyle using a novel double-network hydrogel. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2011; 12: 49.
60. Zaloudíková B., Kelbl M., Pasa L., Freiburger T. Genotypic versus phenotypic methods in the detection of *Listeria monocytogenes* prosthetic joint infection. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(Pt 6): 829-831.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

**Полякова Екатерина Михайловна** – к.б.н. старший научный сотрудник отделения профилактики и лечения раневой инфекции; *Polyakova Ekaterina M.* – PhD, senior researcher of the research department of prevention and treatment of wound infection. e-mail: ekaterinapolyakova@rambler.ru

**Божкова Светлана Анатольевна** – к.м.н. заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии; *Bozhkova Sveilana A.* – PhD, head of the research department of prevention and treatment of wound infection and department of clinical pharmacology. e-mail: clinpharm-rniito@yandex.ru.

Рукопись поступила 21.07.2014