РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ CHLAMYDIA TRACHOMATIS НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ NASBA-REAL -TIME

Гущин А.Е., Рыжих П.Г., Шипулин Г.А.
ГУ ЦНИИ эпидемиологии МЗ СР РФ
Центр молекулярной диагностики инфекционных болезней
Москва

Лабораторная диагностика играет ключевую роль в установлении этиологического диагноза при урогенитальной хламидийной инфекции из-за отсутствия типичных клинических признаков и малосимптомного течения инфекционного процесса. При этом роль «золотого стандарта» все больше играют технологии амплификации нуклеиновых кислот, вытесняя малочувствительный и субъективный метод прямой иммунофлюоресценции и трудоемкую культуральную диагностику. В нашей стране амплификационные технологии для диагностики различных инфекций в том числе ИППП представлены исключительно полимеразной цепной реакцией (ПЦР), в то время как за рубежом уже на протяжении нескольких лет используются коммерческие наборы на основе альтернативных амплификационных технологий – это лигазная цепная реакция (LCR), транскрипционно-опосредованновая реакция (TMA), амплификация со сдвигом цепи (SDA). Общим для амплификационных технологий является использование в качестве мишени уникальных для того или иного вида вирусов или бактерий участков генетического материала (ДНК или РНК), что обеспечивает высокую специфичность, а также экспоненци-

альный характер накопления продуктов реакции, обеспечивающий высокую чувствительность. В тоже время существуют особенности различных технологий, дающие дополнительные возможности при их использовани для диагностики инфекционных агентов.

Как альтернатива ПЦР, в основе которой лежит принцип удвоения генетического материала при делении клеточных систем, была разработана методика, моделирующая в условиях in vitro репликацию ретровирусов [1]. Методика, названная «Self-Sustained Sequence Replication» или 3SR, базируется на конкурентном действии трех ферментов, участвующих в ретровирусной репликации - обратнуой транскриптазы, рибонуклеазы Н (РНКазаН) и ДНК-зависимой РНК-полимеразы. При амплификации РНК-мишени в изотермических условиях (41°С), накапливается множество копий РНК-продукта. Позднее в оптимизированном и более совершенном виде технология на основе 3SR была использована для диагностики ВИЧ под названием NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [2]. Общая схема амплификации РНК на основе NASBA представлена на рисунке 1).

Реакция начинается гибридизацией олигонуклеотидного праймера, содержащего промотор к Т7-РНК- полимеразе (праймер Р1), с РНК-мишенью (сенс-РНК). AMV-обратная транскриптаза удлиняет праймер, создавая ДНК копию с РНК матрицы и формируя гибрид РНК/ДНК. Этот гибрид является субстратом для РНКазы Н, которая гидролизует РНК-часть данного гибрида, оставляя одноцепочечную ДНК, к которой отжигается второй праймер (праймер Р2). Таким образом, формируется субстрат, пригодный для удлинения обратной транскриптазой. В конечном счете, промоторная часть приобретает двуспиральную форму с приобретением транскрипционной активности. Распознавая ставший функциональным промотор, Т7-РНК-полимераза производит множественные копии транскриптов РНК, которые являются обратными (антисенс) по отношению к исходной последовательности РНК-мишени. Каждая вновь синтезируемая молекула антисенс-РНК может выступать в качестве матрицы и может быть преобразована в промежуточную ДНК функциональным промотором Т7. Данный механизм обеспечивает генерирование множества РНК копий от РНК-мишени. Эти, вновь появившиеся молекулы РНК, в свою очередь участвуют в образовании новых копий, благодаря чему, количество молекул РНК растет по экспоненциальному закону. За 90 минут амплификации образуется до -10^9 копий РНК.

Следует выделить некоторые особенности технологий на основе 3SR, которые могут иметь преимущество перед ПЦР при диагностике инфекционных агентов. 3SR является изотермической реакцией, проходящей при постоянной температуре, в результате чего отпадает необходимость в программируемых термостатах – амплификаторах. Как уже было сказано, мишенью для 3SR амплификации в отличие от ПЦР служит молекула РНК,

поэтому при диагностике РНК-геномных вирусов отсутствуют дополнительные манипуляции, связанные со стадией обратной транскрипции. При диагностике бактериальных инфекций мишенью для амплификации служит рибосомальная РНК, что может давать некоторые преимущества. Во-первых, количество копий рибосомальной РНК, входящей в состав рибосом, может достигать от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч на клетку, обеспечивая даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Во-вторых, РНК гораздо менее стабильный по сравнению с ДНК материал и результаты амплификационной диагностики могут быть более адекватны эффективности проводимой антибактериальной терапии. Кроме того, продуктом амплификации является РНК, которая как нестабильный в окружающей среде материал, является контаминационно неопасной, в то время как продукты ПЦР –фрагменты ДНК, наоборот, чрезвычайно стабильны в окружающей среде и создают высокий риск контаминации. Наконец, в некоторых исследованиях, связанных с оценкой экспрессии различных генов, большой проблемой является удаление примесей геномной ДНК при сохранении мРНК. В этом случае амплификационные технологии на основе 3SR имеют преимущество, т.к. не чувствительны к наличию ДНК.

Одна из модификаций методики 3SR - технология TMA (Gen-Probe, USA), лежит в основе коммерческих тест-систем для диагностики некоторых инфекций, в том числе *C. trachomatis*. Результаты многочисленных независимых испытаний показали высокие аналитические характеристики технологии TMA при работе с клиническим материалом. Однако стоимость таких наборов, включая необходимое оборудование, делают их неконкурентноспособными на территории РФ.

В настоящее время NASBA является запатентованным названием технологии, на базе которой выпускаются коммерческие наборы реагентов с торговой маркой «NucliSens» (bioMerieux, The Netherlands).

Комплектация наборов «NucliSens» позволяет пользоваться не только готовыми, а, следовательно, и достаточно дорогими наборами для диагностики конкретных возбудителей, но и разрабатывать праймеры и зонды для амплификации и детекции продуктов реакции с использованием «Базового набора» («Nuclisens Basic Kit»). Однако значительным препятствием для широкого использования технологии NASBA в России, даже с использованием «Базового набора» и возможностью самостоятельной разработки необходимых олигонуклеотидов, оставалась пост-амплификационная детекция продуктов реакции NASBA. Использование, как в случае ПЦР, электрофоретического разделения продуктов – проблематично и неинформативно и требуется применение специфического зонда с последующим анализом результатов гибридизационного взаимодействия. До последнего времени основным способом детекции продуктов амплификации NASBA

служила ECL-детекция – достаточно трудоемкий процесс с использованием специального оборудования. В результате, себестоимость анализа в условиях отечественных лабораторий становилась бы весьма высокой.

Разработанная впервые для ПЦР и стремительно развивающаяся в последние годы технология амплификации в присутствии флюоресцентно-меченных (ФМ) зондов с детекцией продуктов в процессе реакции (Real-time PCR или ПЦР-РРВ) нашла свое применение и для детекции продуктов амплимфикации NASBA. Один из форматов ФМ-зондов – «молекулярные маячки» (molecular beacons), использованный в реакции NASBA положил начало технологии NASBA-Real-time [3]. Механизм накопления уровня флюоресценции с использованием «молекулярных маячков» показан на рисунке 2.

Использование флюоресцентной детекции продуктов NASBA в процессе реакции в режиме реального времени не только упрощает процедуру анализа, но и открывает широкие возможности для разработки тест-систем на основе технологии NASBA и использования их в нашей стране.

Целью нашей работы стала разработка тест-системы для диагностики *Chlamydia trachomatis* на основе технологии NASBA-Real-time с использованием «Базового набора Nuclisens» (bioMerieux, The Netherlands).

«Базовый набор Nuclisens» включает в себя комплект реагентов для экстракции РНК из клинического материала (лизирующий раствор, отмывочные растворы, сорбент Silica и элюирующий буфер) и комплект реагентов для проведения амплификации (солевые компоненты, дНТФ, комплекс ферментов в виде лиофилизированной сферы с AMV- обратной транскриптазой, T7 РНК-полимеразой, РНКазойН и необходимые для их растворения компоненты). Для проведения NASBA-Real-time используется прибор "NucliSens EasyQ Analyzer" (bioMerieux, The Netherlands).

При создании тест-системы нам предстояло решить следующие задачи:

1. Разработать праймеры к специфическому для *C. trachomatis* участку 16S рРНК.

2. Разработать специфический ФМ-зонд «молекулярный маячок» к участку 16S рРНК *C. trachomatis*, фланкированному праймерами.

3. На основе выбранного специфического для *C. trachomatis* участка 16S рРНК сконструировать рекомбинантный положительный контрольный образец РНК (ПКО РНК).

4. Разработать и сконструировать рекомбинантный внутренний контрольный образец РНК (ВКО РНК), а также специфический к нему ФМ-зонд.

5. Приготовить стандартные разведения ВКО РНК и ПКО РНК для оценки аналитической чувствительности тест-системы и выбора оптимальных рабочих концентраций контрольных образцов.

6. Сравнить аналитическую чувствительность разработанной тест-сис-

темы на основе NASBA-Real-time с чувствительностью ПЦР тест-системы «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*» с праймерами к криптической плазмиде на клеточной культуре, содержащей *C. trachomatis.*

7. Сравнить диагностическую чувствительность наборов для ПЦР и NASBA-Real-time на клиническом материале.

Результаты.

Для разработки специфических праймеров и ФМ-зонда был проведен сравнительный анализ генов 16S РНК у широкого спектра микроорганизмов, включая представителей рода Chlamydiaceae на основе информации GeneBank. Был определен участок высоко специфический для *C. trachomatis* и, в пределах данного участка выбраны праймеры CTNSB1 и CTNSB2 и специфический зонд NSB-Z. Фрагмент гена 16S рРНК *C. trachomatis*, включающий область праймеров был амплифицирован с помощью ПЦР и клонирован в экспрессирующий плазмидный вектор, содержащий регуляторные элементы бактериофага Т7 и необходимые структорно-функциональные элементы ms2-фага. Экспрессия РНК, содержащей участок 16S рРНК *C. trachomatis* и упаковка в фаговые частицы в составе генома фага ms2 происходила после трансформации плазмидным вектором соответствующего штамма E.coli. На основе суспензии фага ms2, был получен концентрированный защищенный препарат ПКО РНК. Рекомбинантный вектор с клонированным участком 16S рРНК *C. trachomatis* содержал фрагмент гена gag ВИЧ, что позволило измерить концентрацию РНК с использованием количественного набора «Amplicor HIV – Monitor». На основе серии 10-кратных разведений ПКО-РНК с известной концентрацией была определена аналитическая чувствительность разработанного набора праймеров и зонда. После оптимизации условий реакции аналитическая чувствительность составила ~ $4x10^3$ копий/мл, что соответствует чувствительности тест-системы для детекции *C. trachomatis* на основе NASBA с ECL-детекцией [4]. При разработке ВКО-РНК была изменена гибридизационная область зонда таким образом, чтобы она не была комплиментарна нуклеотидным последовательностям, опубликованным в GeneBank. Конструирование защищенного препарата ВКО РНК проводилось аналогично процедуре, описанной для ПКО РНК. При оценке степени конкуренции в процессе ко-амплификации фрагментов ПКО и ВКО была определена максимальная концентрация ВКО-РНК, при которой аналитическая чувствительность в отношении специфического фрагмента 16S рРНК *C. trachomatis* не снижается. Зонд NSB-Z содержал метки Fam/BHQ1, а зонд для ВКО - ICNSB-Z - метки Rox/BHQ2. Сравнение чувствительности при использовании двух технологий – ПЦР и NASBA проводилось на культуре клеток McCoy, инфицированной клиническим изолятом *C. trachomatis.* Из клеточной культуры были приготовлены 10-кратные разведения препарата очищенных нуклеиновых кислот, которые использовали для амплификации разработанным комплектом реагентов

для NASBA в сравнении с ПЦР-тест-системой «Амплисенс *Chlamydia trachomatis*», использующей праймеры к фрагменту мультикопийной мишени хламидий – криптической плазмиде. Сравнения показали 10-кратное превышение аналитической чувствительности NASBA по сравнению с ПЦР. При сравнении диагностической чувствительности двух технологий было исследовано 56 клинических образцов, из которых по результатам ПЦР положительных и отрицательных образцов было соответственно 29 и 27. Результаты показали 100% совпадение результатов тестирования с использованием NASBA результатам ПЦР-анализа.

Заключение. Впервые в мировой практике была разработана тест-система для диагностики *Chlamydia trachomatis* в клиническом материале с использованием технологии NASBA-Real-time на основе «Базового набора Nuclisense» (bioMerieux, Netherlands). Разработанный комплект реагентов включает: специфические для 16S рРНК *C. trachomatis* праймеры и флюоресцентно-меченный гибридизационный зонд; флюоресцентно-меченный гибридизационный зонд для внутреннего контрольного образца РНК; ВКО РНК и ПКО РНК в виде фаговых препаратов со стандартной концентрацией. Аналитическая чувствительность с использованием NASBA-Real-time оказалась выше по сравнению с ПЦР, в то время как диагностическая чувствительность обоих тестов была одинаковой.

Использование данной технологии в лабораторной практике может увеличить информативность молекулярно-биологического анализа.

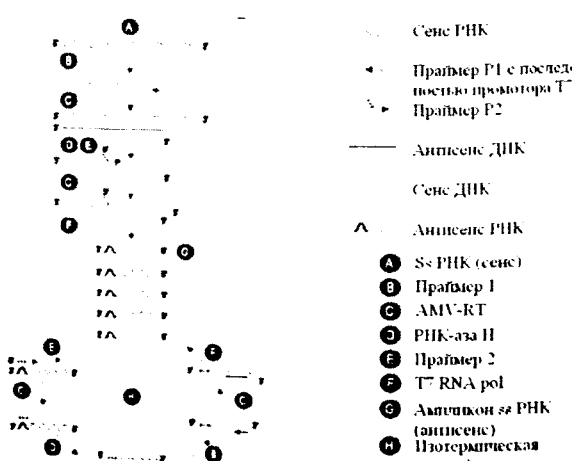

Рисунок 1.
Схема амплификации РНК на основе NASBA

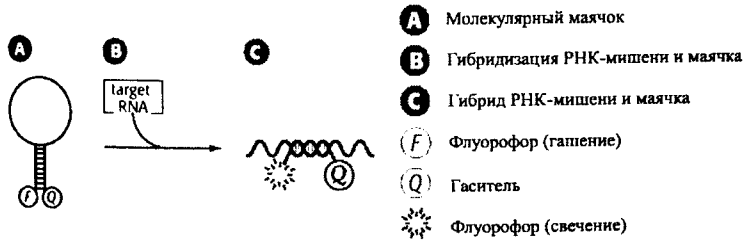

Рисунок 2.

Механизм накопления уровня флюоресценции с использованием «молекулярных маячков»

Литература.

1. Guatelli J.C., Whitfield K.M., Kwoh D.Y., et al., «Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by multienzyme reaction modeled after retroviral replication» Proc. Natl. Acad. Sci., 1990, V.87., P.1874-1878

2. Kievits T., van Gemen B., et al., «NASBA isotermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized fort he diagnosis of HIV-1 detection» J.Virol. Method, 1991, V 35, P.273-286.

3. Leone G., van Schijndel H., et al., «Moleculare beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA» Nucleic Acids Res., 1998., V.26, P.2150-2155.

4. Mahony JB, Song X, et al., «Evaluation of the NucliSens Basic Kit for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in genital tract specimens using nucleic acid sequence-based amplification of 16S rRNA» J. Clin. Microbiol. 2001., V.39, P. 1429-1435.