

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.841.11:579.25].083.3

Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Батурин А.А., Шпак И.М., Плеханова Н.Г.

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (NASBA) В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

*Полиморфизм клинических проявлений мелиоидоза и сапа наряду с тяжёлым течением и высокой летальностью обуславливают необходимость совершенствования диагностических средств для обнаружения возбудителей данных заболеваний. Перспективность разработки диагностических наборов на основе реакции транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени определяется высокой аналитической чувствительностью и возможностью осуществлять верификацию результатов других методов выявления патогенных буркхольдерий. Для разработки набора реагентов на основе технологии NASBA в реальном времени в качестве мишени амплификации выбран фрагмент гена 23S рРНК. Высокая специфичность сконструированных олигонуклеотидов экспериментально подтверждена при анализе широкого набора штаммов гетерологичных видов микроорганизмов и секвенированием нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена 23S рРНК. Аналитическая чувствительность разработанного набора реагентов позволила выявить *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* в концентрации 1×10^1 м.к./мл в анализируемой пробе. Показаны высокие функциональные характеристики разработанной системы при исследовании проб биологического материала и возможность её использования для решения вопросов, связанных с получением дискордантных результатов при обнаружении патогенных буркхольдерий.*

Ключевые слова: мелиоидоз; сап; диагностика; NASBA; детекция в реальном времени.

Для цитирования: Леденева М.Л., Ткаченко Г.А., Батурин А.А., Шпак И.М., Плеханова Н.Г. Разработка и применение набора реагентов для выявления РНК возбудителей мелиоидоза и сапа на основе транскрипционной амплификации (NASBA) в режиме реального времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 651-657. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-651-657>

Ledenyova M. L., Tkachenko G. A., Baturin A. A., Shpak I. M., Plekhanova N. G.

THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF REAGENTS KIT FOR DETECTION RNA OF THE CAUSATIVE AGENTS OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS BY TRANSCRIPTION-BASED AMPLIFICATION (NASBA) IN REAL-TIME

Volgograd Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 40013, Volgograd, Russia

The polymorphism of clinical manifestations of melioidosis and glanders and their high mortality require improvement of diagnostics for detection of this agents. The perspectivity of development of transcription-based amplification real-time NASBA diagnostic kits is determined by high analytical sensitivity and the opportunity to perform the verification of the results of other methods for pathogenic Burkholderia species detection. The fragment of 23S rRNA gene was selected as the target for development of real-time NASBA kit. The high specificity of the constructed oligonucleotides was confirmed during the analysis of wide range of heterologous strains of microorganisms and sequencing of amplified fragments of 23S rRNA gene. The analytical sensitivity of the developed kit allowed to detect Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei in concentration of 1×10^1 microbial cells per ml. The high functional characteristics of developed kit as well as the possibility to use it in case of appearance of discordant result during the detection of pathogenic Burkholderia species were demonstrated while studying biological samples.

Key words: melioidosis; glanders; diagnosis; NASBA; real-time detection.

For citation: Ledenyova M.L., Tkachenko G.A., Baturin A.A., Shpak I.M., Plekhanova N.G. The development and application of reagents kit for detection RNA of the causative agents of melioidosis and glanders by transcription-based amplification (NASBA) in real-time. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (10): 651-657 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-651-657>

For correspondence: Ledenyova M.L., researcher of the department of genodiagnostics; e-mail: volresin@yandex.ru

Information about authors:

Ledenyova M. L., <https://orcid.org/0000-0001-5923-4774>

Tkachenko G. A., <http://orcid.org/0000-0003-0199-3342>

Baturin A. A., <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>

Shpak I. M., <http://orcid.org/0000-0001-6446-0274>

Plekhanova N. G. <http://orcid.org/0000-0002-2471-8776>

Для корреспонденции: Леденева Маргарита Леонтьевна, науч. сотрудник лаб. генодиагностики; e-mail: volresin@yandex.ru

Acknowledgment. *This work was supported by the Foundation for the promotion of innovations under the «UMNIK» program (№2542ГУ1/2014 and №6763ГУ2/2015) and by the scientific research «The application of isothermal amplification technologies to improve methods for pathogenic Burkholderia species detection» (cipher 089-2-17).*

Conflict of interest. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Received 24.07.2018
Accepted 20.09.2018

Введение. Патогенные буркхольдерии – возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*) – занимают особое место в клинической микробиологии, что связано с их способностью вызывать опасные тяжело протекающие инфекции человека и широкого круга видов животных [1–3]. *B. pseudomallei* и *B. mallei* относят ко второй группе патогенных для человека микроорганизмов и считают потенциальными агентами биотерроризма [4, 5].

Разнообразие симптомов мелиоидоза и сапа исключает возможность на основании клинических проявлений установить правильный диагноз, в связи с чем ведущая роль при определении этиологии этих заболеваний отводится лабораторной диагностике. Идентификация патогенных буркхольдерий остаётся трудной задачей [6–9].

С развитием методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) появились новые возможности для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа. В последние годы в лабораторной диагностике различных инфекций помимо полимеразной цепной реакции (ПЦР) всё большее распространение получают методы детекции РНК, к которым относится основанная на транскрипции амплификация нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [10–12]. NASBA протекает при фиксированной температуре (41°C) в течение 90–120 мин и основана на обнаружении фрагмента нуклеиновой кислоты с помощью 2 специфичных праймеров и совместной ферментативной активности трёх ферментов – AMV-ревертазы, РНКазы H *Escherichia coli*, РНК-полимеразы фага T7. При этом происходит экспоненциальная амплификация нуклеиновых кислот, главным образом одноцепочечной РНК, которая является удобной мишенью для гибридизационных методов детекции. Технология флуоресцентно-меченых зондов позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации непосредственно в процессе реакции в режиме реального времени, что существенно сокращает время анализа, снижает риск контаминации, увеличивает специфичность метода [13].

Транскрипционная амплификация NASBA с детекцией результатов в режиме реального времени – real-time NASBA (RT-NASBA) – является одним из наиболее чувствительных тестов, применяемых для диагностики различных инфекций, поскольку мишенью для исследования являются молекулы матричной РНК (мРНК) или рибосомальной РНК (рРНК) микроорганизмов, количество которых может достигать нескольких десятков тысяч на одну бактериальную клетку. Используемые в качестве мишени амплификации при проведении ПЦР даже многокопийные участки ДНК не превышают двух десятков на одну клетку. В связи с этим метод NASBA позволяет детектировать возбудителей в тех случаях, когда их количество очень мало и недостаточно для выявления методом ПЦР, обеспечивая даже при минимальной концентрации бактериальных клеток в пробе достаточно высокую концентрацию мишеней для амплификации. Это особенно актуаль-

но в случае латентной формы мелиоидоза, протекающей на фоне отсутствия клинических признаков заболевания [14].

Другим важным преимуществом реакции NASBA по сравнению с ПЦР является уникальная способность метода транскрипционной амплификации избирательно синтезировать специфическую последовательность РНК в присутствии идентичной последовательности ДНК, что позволяет оценивать наличие жизнеспособных микроорганизмов в образце в процессе и после терапии. Патогенные буркхольдерии в ходе лечения быстро приобретают резистентность к различным антибактериальным препаратам, нередко резистентность носит множественный характер [15, 16]. Разработка генодиагностической тест-системы на основе реакции транскрипционной амплификации NASBA позволит добиться высокой чувствительности при обнаружении *B. pseudomallei* и *B. mallei* и будет являться инструментом контроля эффективности проведённой терапии.

Цель работы – разработка набора реагентов на основе транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени и оценка возможности его использования для обнаружения РНК возбудителей мелиоидоза и сапа при исследовании проб биологического материала.

Материал и методы. Программы и базы данных. Для выбора мишени амплификации использованы нуклеотидные последовательности, полученные из международной базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Множественное выравнивание и сравнительный анализ фрагментов генов осуществляли с помощью модуля MUSCLE программы Unipro UGENE 1.30. Дизайн олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения Primer3Plus и OLIGO 6.0. Вторичную структуру и термодинамические параметры разработанного зонда оценивали в онлайн-режиме с помощью сервера Mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu>). Специфичность выбранных олигонуклеотидов проверяли в режиме online с использованием поисковой системы BLAST Национального центра биотехнологической информации (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы 20 штаммов *B. pseudomallei*, 14 штаммов *B. mallei* и 24 штамма гетерологичных микроорганизмов, включающих 12 штаммов *Burkholderia cepacia*, 5 штаммов *Burkholderia thailandensis*, по 1 штамму *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*. Набор штаммов получен из коллекции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Все исследуемые штаммы имели типичные культуральные, морфологические и биохимические свойства. Работу с культурами возбудителей проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Питательные среды и условия культивирования. Штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 5% глицерина при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч. Культивирование гетерологичных видов микроорганизмов проводили с использованием общепринятых требований в соответствии с видом [17].

Экспериментальное заражение лабораторных животных. Экспериментальное заражение выполняли на половозрелых золотистых хомячках массой 80–100 г, полученных из питомника ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Все манипуляции с животными, включая эвтаназию, выполняли в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Для моделирования мелиоидозной и сапной инфекций использовали штаммы *B. pseudomallei* С-141 и *B. mallei* 10230 соответственно. Заражение осуществляли подкожно суспензиями суточных агаровых культур в объёме 0,5 мл 0,15М NaCl в концентрации 1×10^3 м.к./мл. В ходе эксперимента заражено по 4 золотистых хомячка каждым возбудителем. Биологический материал забирали на 4-е сутки от момента заражения. От каждого экспериментально заражённого животного получены кусочки внутренних органов (лимфатический узел, печень, селезёнка, лёгкое), кровь.

Выделение нуклеиновых кислот. Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с использованием коммерческих наборов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва) и «РИБО-золь-С» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

Определение концентрации РНК. Измерение концентрации РНК проводили при помощи коммерческого набора QubitTM RNA HS Assay Kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», Invitrogen, США) и флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

Проведение real-time NASBA. Для постановки транскрипционной амплификации NASBA в режиме реального времени отдельно готовили раствор ферментов и реакционную смесь. Раствор ферментов объёмом 2,7 мкл включал AMV-ревертазу («Promega», США), РНКазу *H. coli* («Thermo Scientific», США), РНК-полимеразу фага T7 («Thermo Scientific», США), бычий сывороточный альбумин («Fermentas», США). Реакционная смесь объёмом 12,3 мкл содержала все остальные компоненты реакции: Tris-HCl (pH 8,5), dNTP («Fermentas», США), NTP («Fermentas», США), MgCl₂ («Dialat Ltd», Россия), KCl («Sigma-Aldrich», Германия), DTT («Fermentas», США), ДМСО («AppliChem», Германия), праймеры и зонд (синтез ЗАО «Синтол», Россия).

В микроцентрифужные пробирки объёмом 0,2 мл вносили 12,3 мкл приготовленной реакционной смеси и 5 мкл экстракта РНК анализируемых образцов, после чего термостатировали в следующем режиме: $65^\circ\text{C} - 5$ мин, $41^\circ\text{C} - 5$ мин. По окончании инкубации добавляли раствор ферментов и устанавливали пробирки в амплификатор. В качестве отрицательного контрольного образца в реакционную смесь добавляли РНК-буфер. Изотермическую амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene Q («QIAGEN GmbH», Германия) в следующем режиме: $41^\circ\text{C} - 5$

мин, затем 95 циклов ($41^\circ\text{C} - 60$ с) с детекцией интенсивности флуоресцентного сигнала по каналу Green.

В рамках апробации разработанного набора реагентов проводили сравнение с зарегистрированным набором реагентов на основе ПЦР-РВ «Амплиген Burk» (РЗН 2013/1227, ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Проведение молекулярно-генетических исследований осуществляли в соответствии с требованиями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Секвенирование продуктов амплификации. Для подтверждения специфичности подобранных олигонуклеотидов полученные продукты амплификации секвенированы с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) и автоматического генетического анализатора ABI 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Статистическая обработка результатов исследования. Для сравнительного анализа эффективности разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA с ПЦР-РВ и культуральным методом использован непараметрический критерий МакНемара с поправкой Йейтса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [18].

Результаты. На основе изучения *in silico* структуры рибосомального кластера генов (*16S pPHK*, *23S pPHK*, *5S pPHK*) в составе секвенированных нуклеотидных последовательностей широкого спектра микроорганизмов, представленных в базе данных GenBank, для конструирования праймеров и флуоресцентно-меченого зонда с целью детекции патогенных буркхольдерий выбран ген *23S pPHK* (GenID: 3112968 (BPSLR08)). При выборе олигонуклеотидов руководствовались принципами высокой специфичности по отношению к гену-мишени, отсутствием неспецифических сайтов связывания, минимальными меж-, внутрипраймерными, самокомплементарными взаимодействиями и правилами, приведёнными в работе В. Deiman и соавт. [19].

Выбрана пара праймеров *Burk23SrRNA-T7-P1* и *Burk23SrRNA-P2*, длина нуклеотидной последовательности которых составила соответственно 53 и 19 нуклеотидов. При конструировании праймера *Burk23SrRNA-T7-P1* для формирования функционального промотора T7 РНК-полимеразы к 5'-концевому участку добавлена последовательность длиной 25 нуклеотидов. Между промоторной зоной праймера *Burk23SrRNA-T7-P1* и его участком, гибридизующимся с мишенью, дополнительно включены три пуриновых нуклеотида с целью улучшения амплификации. Расчётный размер фрагмента гена *23S pPHK*, фланкируемого предлагаемыми праймерами, составил 159 п.н. (табл. 1).

Для детекции продуктов реакции RT-NASBA сконструирован флуоресцентно-меченый зонд *Burk23SrRNA-MM* в формате «молекулярный маяк», потенциально способный гибридизоваться с амплифицированными мишенями 23S рРНК возбудителей мелиоидоза и сапа с образованием стабильных гибридов при температуре 41°C . В качестве флуоресцентной метки на 5'-конце зонд содержал флуорофор FAM (поглощение λ 490 нм; флуоресценция λ 520 нм), на 3'-конце – гаситель флуоресценции RTQ-1 с диапазоном гашения 470–570 нм (см. табл. 1).

Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для RT-NASBA

Наименование праймеров/зонда	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Длина РНК-ампликона
Burk23SrRNA-T7-P1	5'-AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACG GCT AAC AAT ACA AAT AAA GAG TA-3'	159 п.н.
Burk23SrRNA-P2	5'-CCT TTT GGG TCA TCC TAG A-3'	
Burk23SrRNA-MM	5'(FAM)-CCA CAC ATA GGT CTA GTG AGG CGT GTG G-(RTQ-1)3'	

Таблица 2

Состав рабочей смеси для проведения реакции NASBA в режиме реального времени

Компонент смеси*	Конечная концентрация компонента в смеси
Tris-HCl, pH 8,5 (1 М)	40 мМ
Раствор dNTP (25 мМ)	1 мМ
Раствор NTP (25 мМ)	2 мМ
Раствор MgCl ₂ (100 мМ)	12 мМ
Раствор KCl (1 М)	87 мМ
Раствор DTT (100 мМ)	0,5 мМ
ДМСО (100%)	15% (v/v)
Праймер <i>Burk23SrRNA-T7-P1</i> (10 пмоль/мкл)	0,125 мкМ
Праймер <i>Burk23SrRNA-P2</i> (10 пмоль/мкл)	0,125 мкМ
Зонд <i>Burk23SrRNA-MM</i> (5 пмоль/мкл)	0,0625 мкМ
Бычий сывороточный альбумин (20 мг/мл)	2,1 мкг
Обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц (10 ед. акт./мкл)	6,4 ед. акт.
РНКаза <i>H. coli</i> (0,2 ед. акт./мкл)	0,08 ед. акт.
РНК-полимераза фага T7 (20 ед. акт./мкл)	32 ед. акт.
Исследуемый образец РНК	5 мкл

Примечание. * – в скобках указана концентрация исходного раствора реагента; ед. акт. – единицы активности.

Изотермичность реакции транскрипционной амплификации NASBA устраняет необходимость термоденатурации и экспериментального подбора оптимальной температуры для отжига праймеров. Изотер-

мичность процесса предъявляет высокие требования к составу реакционной смеси, обеспечивающей стабильность многокомпонентной ферментативной системы и предотвращающей образование нежелательных вторичных структур в РНК. Ключевым компонентом в составе реакционной смеси, определяющим специфичность взаимодействия разработанных олигонуклеотидов с РНК-мишенью, является концентрация хлорида калия. Экспериментально апробированы различные концентрации KCl в диапазоне 70–90 мМ, праймеров – 0,1–0,25 мкМ, зонда – 0,04–0,2 мкМ. Оптимизированный состав рабочей смеси объемом 20 мкл для проведения транскрипционной амплификации RT-NASBA приведен в табл. 2.

Для определения аналитической чувствительности разработанного набора реагентов исследованы серии 10-кратных разведений культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* в концентрации от 1×10^0 до 1×10^6 м.к./мл (см. рисунок). Значение минимальной аналитической чувствительности реакции составило 0,4 фг/мкл тотальной РНК в образце, что соответствовало 1×10^1 м.к./мл. При экспериментальном определении аналитической специфичности разработанного набора олигонуклеотидов использована панель, содержащая геномную РНК человека, лошади, золотистого хомячка, 24 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Отрицательные результаты RT-NASBA с каждым из вышеперечисленных образцов позволили оценить специфичность набора по использованной выборке образцов как 100%. Выявлена специфическая амплификация разработанного набора реагентов со всеми исследованными штаммами *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

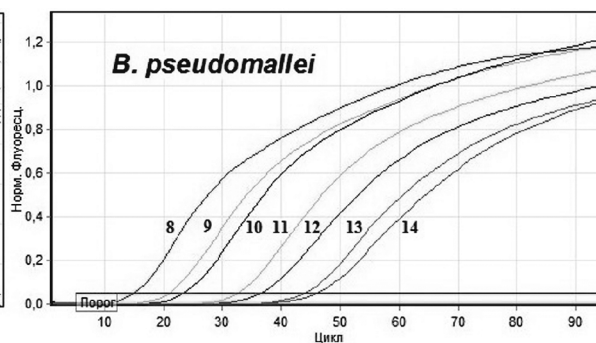
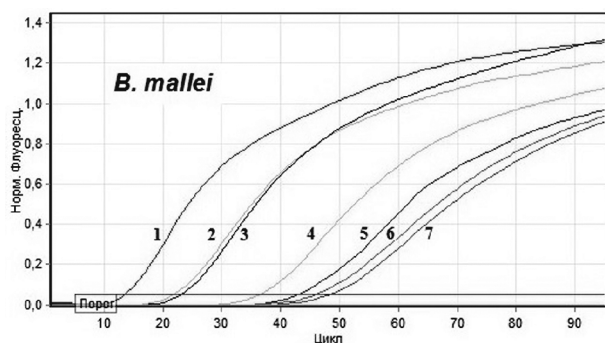


График нарастания кривых флуоресценции при амплификации РНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*, полученных при определении чувствительности разработанного набора реагентов на основе реакции NASBA в режиме реального времени:

1 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^6 м.к./мл, пороговый цикл Ct 13,51; 2 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^5 м.к./мл, пороговый цикл Ct 21,81; 3 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^4 м.к./мл, пороговый цикл Ct 23,14; 4 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^3 м.к./мл, пороговый цикл Ct 36,48; 5 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^2 м.к./мл, пороговый цикл Ct 42,78; 6 – *B. mallei* 10230 в концентрации $0,5 \times 10^2$ м.к./мл, пороговый цикл Ct 45,84; 7 – *B. mallei* 10230 в концентрации 1×10^1 м.к./мл, пороговый цикл Ct 48,14; 8 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^6 м.к./мл, пороговый цикл Ct 15,07; 9 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^5 м.к./мл, пороговый цикл Ct 20,92; 10 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^4 м.к./мл, пороговый цикл Ct 23,52; 11 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^3 м.к./мл, пороговый цикл Ct 32,63; 12 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^2 м.к./мл, пороговый цикл Ct 36,54; 13 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации $0,5 \times 10^2$ м.к./мл, пороговый цикл Ct 43,93; 14 – *B. pseudomallei* C-141 в концентрации 1×10^1 м.к./мл, пороговый цикл Ct 46,05

Таблица 3

Сравнение трёх методов обнаружения *B. pseudomallei* и *B. mallei* у животных с острой формой инфекционного процесса

Вид материала	Номер животного	<i>B. pseudomallei</i>			<i>B. mallei</i>		
		Бак. посев	ПЦР-РВ	RT-NASBA	Бак. посев	ПЦР-РВ	RT-NASBA
Лимфатический узел	1	+	+	+	-	-	+
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	+	+	+
Печень	1	+	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	-	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
Селезёнка	1	-	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	-	+	+
	4	+	+	+	+	+	+
Лёгкое	1	+	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	-	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	+
Кровь	1	-	-	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	+
	3	-	-	+	-	-	-
	4	-	-	+	-	-	-

В дальнейшем для проверки специфичности продуктов, полученных в результате амплификации с разработанным набором реагентов, проведено их секвенирование. При последующем сравнении с последовательностями, представленными в генетической базе данных GenBank, установлена 100% гомология секвенированных продуктов амплификации с соответствующими участками геномов различных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

С целью оценки возможности применения разработанного набора реагентов для анализа клинических образцов исследован биологический материал, взятый от золотистых хомячков при экспериментальной инфекции. Параллельно материал исследован культуральным методом и ПЦР-РВ. Исследовано 32 пробы внутренних органов и 8 проб крови от экспериментально заражённых животных (табл. 3).

Совпадение положительных результатов всех трёх методов исследования – культурального, ПЦР-РВ и RT-NASBA – при анализе биологического материала от животных, достоверно свидетельствующее о наличии возбудителя в образце, выявлено в 13 пробах из 20 (65%) и 7 пробах из 20 (35%) при обнаружении *B. pseudomallei* и *B. mallei* соответственно. При совместном применении культурального метода и ПЦР-РВ дискордантные результаты при обнаружении возбудителей мелиоидоза и сапа составили 15% (1 проба печени, 1 проба селезёнки, 1 проба лёгкого) и 25% (2 пробы печени, 2 пробы селезёнки, 1 проба лёгкого) соответственно. Несовпадающие результаты при использовании этих методов исследования обусловлены положительными результатами ПЦР-РВ без выделения культуры патогенов. С помощью RT-NASBA анализ образцов, дискордантных по результатам культурального метода и ПЦР-РВ, позволил обнаружить РНК патогенных буркхольдерий во всех случаях несовпадаю-

щих результатов. Исследование проб биологического материала, в которых получены отрицательные результаты при проведении бактериологического посева и ПЦР-РВ, с использованием разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA позволило выявить *B. pseudomallei* в 3 пробах крови и *B. mallei* в 3 пробах (1 проба лимфатического узла, 1 проба лёгкого и 1 проба крови).

При анализе материала от контрольной группы животных с помощью разработанного набора реагентов на основе технологии транскрипционной амплификации RT-NASBA, культурального метода и ПЦР-РВ результаты исследования всех проб были отрицательными.

При статистическом анализе выявлено, что ПЦР-РВ и RT-NASBA одинаково эффективны для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа ($\chi^2 = 2,083$; $p = 0,149$). При сравнении результатов культурального метода и RT-NASBA большая эффективность обнаружения *B. pseudomallei* и *B. mallei* показана при использовании разработанного набора реагентов ($\chi^2 = 5,042$ при $p = 0,025$ и $\chi^2 = 7,031$ при $p = 0,009$ соответственно).

Обсуждение. В прокариотических клетках содержится порядка 20 тыс. молекул рРНК. Высокая представленность рРНК в клетке послужила основным критерием при выборе мишени амплификации для разработки набора реагентов на основе транскрипционной амплификации NASBA. Несмотря на высокую степень гомологии данного гена у представителей рода *Burkholderia*, варибельность отдельных нуклеотидов в пределах гена 23S рРНК позволила сконструировать специфичные праймеры и флуоресцентно-меченый зонд для детекции продуктов амплификации в режиме реального времени. Разработанный набор реагентов показал высокую аналитическую чувствительность – до 1×10^1 м.к./мл и 100% специфичность при исследовании чистых культур гетерологичных микроорганизмов. Специфичность выявления генетического материала возбудителей мелиоидоза и сапа подтверждена определением нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов гена 23S рРНК патогенных буркхольдерий.

Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа, направленная на выделение чистой культуры возбудителя с последующей её идентификацией, является достаточно сложной процедурой и позволяет получить положительный ответ лишь через 36–48 ч. Использование полуавтоматических систем при анализе чистых культур порой не позволяет правильно идентифицировать *B. pseudomallei* и *B. mallei* [20, 21]. Серологический метод даёт более быстрые результаты, но обладает относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью из-за возможных перекрёстных реакций с гетерологичными видами микроорганизмов и антигенной варибельностью штаммов [22]. Диагностическая ценность серологического метода ограничена при выявлении патогенных буркхольдерий на ранних стадиях инфекционного процесса. Можно констатировать, что молекулярно-генетические технологии внесли значительный вклад в совершенствование средств диагностики мелиоидоза и сапа и упрочили значение ПЦР в качестве эффективного метода для экспресс-диагностики [23–25].

На российском рынке доступны наборы реагентов

для выявления патогенных буркхольдерий методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («Амплиген Burk», РУ РЗН 2013/1227), электрофоретическим учётом результатов («Burk 23S-Eph», РУ № ФСР 2012/13066) и набор, предназначенный для выявления и дифференциации возбудителей бруцеллёза, сапа и мелиоидоза – ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ (РУ № РЗН 2015/2697). Чувствительность указанных тест-систем согласно инструкциям производителей составляет не менее 1×10^3 копий/мл. В рамках разработки и апробации установлено, что с помощью сконструированного набора реагентов на основе транскрипционной амплификации RT-NASBA можно обнаружить возбудитель в концентрации как минимум в 10 раз меньшей, чем существующие тест-системы на основе ПЦР.

Ни один из перечисленных методов диагностики не обладает абсолютной специфичностью и чувствительностью в диапазоне заявленных значений, что связано с возможностью возникновения ошибок на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах клинического лабораторного исследования. Даже в случае применения ПЦР унифицированные методы пробоподготовки и детектирования продуктов амплификации при полной автоматизации процесса не исключают возможности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов, поскольку определение аналитических и диагностических характеристик проводится на ограниченном наборе штаммов микроорганизмов и проб биологического материала.

Выходом из сложившейся ситуации является комбинация методов, что, безусловно, повышает надёжность получаемого результата. Согласно рекомендациям Центра по контролю и профилактике заболеваемости (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, США), в связи с высокой аналитической чувствительностью амплификационных методов верификацию их результатов следует проводить на основе альтернативных МАНК-тестов. Предложены требования, которым должен соответствовать дополнительный метод для решения вопросов, связанных с дискордантными результатами: аналитическая чувствительность дополнительного метода должна быть сопоставима с исследуемым, должны использоваться другая мишень и принцип амплификации [26]. Одним из методов, соответствующих предложенным требованиям, является метод транскрипционной амплификации RT-NASBA.

Для определения функциональных характеристик и оценки возможности использования разработанного набора реагентов для решения вопросов, связанных с получением дискордантных результатов, исследованы пробы биологического материала от экспериментально заражённых животных. При совместном учёте результатов культурального метода и ПЦР-РВ патогенные буркхольдерии обнаружены в 20 пробах из 40 (50%), дискордантные результаты получены в 8 пробах из 40 (20%), отрицательные результаты обоих методов – в 12 пробах из 40 (30%). Дискордантность результатов во всех случаях связана с получением отрицательных результатов при проведении культурального метода исследования, что свидетельствует о большей эффективности ПЦР-РВ на ранних сроках инфекционного процесса. Дальнейший анализ с помощью RT-NASBA подтвердил наличие возбудителя во всех случаях выявленных дискордантных результатов. Большая чувствительность разработанного набора реагентов на основе транскрип-

ционной амплификации RT-NASBA позволила не только подтвердить наличие *B. pseudomallei* и *B. mallei* во всех случаях положительных и дискордантных результатов, но и обнаружить патогенные буркхольдерии в 6 пробах с отрицательными результатами бактериологического исследования и ПЦР-РВ. Выявляемость патогенных буркхольдерий с применением разработанного набора реагентов на основе RT-NASBA составила 85%. Сравнительный анализ обнаружения возбудителей мелиоидоза и сапа на ранних сроках инфекционного процесса при исследовании проб биологического материала от заражённых животных продемонстрировал, что реакция транскрипционной амплификации NASBA более эффективна, чем культуральный метод.

Заключение. Впервые в лабораторной практике для выявления РНК *B. pseudomallei* и *B. mallei* разработан набор реагентов на основе технологии транскрипционной амплификации RT-NASBA. Апробация разработанного набора реагентов продемонстрировала высокую чувствительность (до 1×10^1 м.к./мл) и специфичность (100%) при исследовании культур микроорганизмов и проб биологического материала. Разработанный набор реагентов на основе реакции RT-NASBA как независимый высокочувствительный молекулярно-биологический метод может выступать в роли референсного теста и использоваться в лабораторной практике в спорных случаях, когда результаты других методов выявления патогенных буркхольдерий не совпадают.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» (№2542ГУ1/2014 и №6763ГУ2/2015) и в рамках НИИР «Применение технологий изотермической амплификации для совершенствования методов выявления патогенных буркхольдерий» (шифр 089-2-17).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 5–16, 19, 20, 22–26 см. REFERENCES)

4. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник Российской академии наук*. 2003; 73 (3): 195–204.
17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство*. 2-е изд., переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико»; 2013.
18. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: Медиа Сфера; 2003.
21. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В. и др. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (8): 502–7.

REFERENCES

1. Perumal Samy R., Stiles B.G., Sethi G., Lim L.H.K. Melioidosis: Clinical impact and public health threat in the tropics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11 (5): e0004738.
2. Princess I., Ebenezer R., Ramakrishnan N., Daniel A.K., Nandini S., Thirunarayan M.A. Melioidosis: An Emerging Infection with Fatal Outcomes. *Indian J. Crit. Care Med.* 2017; 21 (6): 397–400.
3. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. of Rare Dis.* 2013; 8: 131–7.
4. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynyuk R.A. Bioterrorism: a national and global threat. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2003; 73 (3): 195–204. (in Russian)

5. Cheng A.C., Dance D.A., Currie B.J. Bioterrorism, Glanders and melioidosis. *Euro Surveill.* 2005; 10 (3): E1–2.
6. Howard K., Inglis T.J.J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin Microbiol.* 2003; 41 (7): 3312–6.
7. Glass M.B., Beesley C.A., Wilkins P.P., Hoffmaster A.R. Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80 (6): 1023–8.
8. Gilmore G., Barnes J., Ketheesan N., Norton R. Comparison of the use of *Burkholderia thailandensis*, *B. cepacia* and *B. pseudomallei* antigens in indirect haemagglutination assay for melioidosis. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 november 2007), Thailand. 2007.
9. Sorenson A.E., Williams N.L., Morris J.L., Ketheesan N., Norton R.E., Schaeffer P.M. Improved diagnosis of melioidosis using a 2-dimensional immunoarray. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 77 (3): 209–15.
10. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (5): 1457–66.
11. Sidoti F., Bergallo M., Costa C., Cavallo R. Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Mol. Biotechnol.* 2013; 53 (3): 352–62.
12. Maffert P., Reverchon S., Nasser W., Rozand C., Abaibou H. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 36 (10): 1717–31.
13. Fakruddin M., Mazumdar R.M., Chowdhury A., Mannan K.S.B. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) – prospects and applications. *Int. J. Life Sci. Pharma. Res.* 2012; 2: 106–21.
14. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18 (2): 383–416.
15. Smith M.D., Wuthiekanun V., Walsh A.L., White N.J. In-vitro activity of carbapenem antibiotics against beta-lactam susceptible and resistant strains of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996; 37 (3): 611–5.
16. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014; 43 (4): 310–18.
17. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical Guidance. [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney: Prakticheskoe rukovodstvo]*. 2nd ed. processed and added. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
18. Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. *[Statisticheskii analiz meditsinskikh dannyykh]*. Moscow: Media Sphera; 2003. (in Russian)
19. Deiman B., van Aarle P., Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification (NASBA). *Mol. Biotech.* 2002; 20 (2): 163–79.
20. Karger A., Stock R., Ziller M., Elschner M.C., Bettin B., Melzer F et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 229.
21. Lopasteyskaya Ya.A., Molchanova E.V., Sharov T.N., Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Viktorov D.V. et al. The application of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization (MALDI-ToF) for identifying agents of glanders and melioidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61 (8): 502–7. (in Russian)
22. Limmathurotsakul D., Peacock S.J. Melioidosis: a clinical overview. *Br. Med. Bull.* 2011; 99: 125-39.
23. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Al Dahouk S., Scholz H.C., Reisinger E.C. et al. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell Probes.* 2005; 19 (1): 9-20.
24. Meumann E.M., Novak R.T., Gal D., Kaestli M.E., Mayo M., Hanson J.P. et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44 (8): 3028-30.
25. Lowe C.W., Satterfield B.A., Nelson D.B., Thiriot J.D., Heder M.J., March J.K. et al. Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei*, and *B. thailandensis*. *PLoS ONE.* 2016; 11 (10): e0164006.
26. McAdam A.J. Discrepant analysis: how can we test a test? *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (6): 2027-9.

Поступила 24.07.18

Принята к печати 20.09.18