



© Е.В. Шипицына,
О.В. Будилковская,
А.М. Савичева

НИИ акушерства и гинекологии
им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

МЕТОД АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ NASBA (NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION) И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ В АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

■ Метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) находит все более широкое применение в диагностической молекулярной микробиологии, в частности, при диагностике инфекций у беременных женщин и новорожденных детей.

Метод NASBA обладает уникальной способностью избирательно амплифицировать специфическую последовательность РНК в присутствии идентичной последовательности ДНК, что определяет основные области его применения: диагностика РНК-содержащих вирусов, изучение экспрессии бактериальных и вирусных генов, диагностика бактериальных инфекций, основанная на выявлении 16S рРНК. В данном обзоре изложены принцип и основные этапы метода NASBA, приведены примеры его применения в диагностической микробиологии, а также дана сравнительная характеристика метода NASBA и других методов амплификации нуклеиновых кислот, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и обратнотранскриптная ПЦР (ОТ-ПЦР).

■ Ключевые слова: амплификация нуклеиновых кислот; РНК; транскрипция; диагностика бактериальных и вирусных инфекций

Введение

Последние достижения молекулярной биологии сделали возможной разработку чувствительных, специфичных, быстрых и высокотехнологичных методов микробиологической диагностики, основанных на анализе нуклеиновых кислот. Эти методы обеспечивают амплификацию минимального количества нуклеиновых кислот, позволяя тем самым выявить генетический материал микроорганизма в концентрации, намного меньшей нижнего предела детекции традиционных микробиологических тестов, что крайне важно при тестировании небольшого количества клинического материала, особенно у новорожденных детей. К числу таких методов относится основанная на транскрипции амплификация нуклеиновых кислот (NASBA) (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) [5], которая все более широко применяется в молекулярной микробиологии, и особенно эффективно этот метод используется для выявления РНК. В основе метода NASBA лежит обнаружение специфического фрагмента нуклеиновой кислоты с помощью двух специфических праймеров и трех ферментов: обратной транскриптазы (ревертазы) вируса миелобластома птиц (*avian myeloblastosis virus — AMV*), РНКазы *H. Escherichia coli* и РНК-полимеразы фага T7. В данном обзоре изложен принцип метода NASBA и описаны этапы анализа с его применением, а также обозначены основные направления его развития и приведены примеры применения метода в диагностической практике. Кроме того, дана сравнительная оценка метода NASBA и двух других методов амплификации нуклеиновых кислот, широко используемых в диагностике инфекционных заболеваний, — полимеразной цепной реакции (ПЦР) и обратнотранскриптной ПЦР (ОТ-ПЦР).

Принцип метода

Реакция протекает при фиксированной температуре (41 °C): при участии AMV-ревертазы, РНКазы H, T7 РНК-полимеразы и двух специфических праймеров происходит экспоненциальная амплификация нуклеиновых кислот, результатом чего является накопление миллиардов копий РНК. Схема реакции представлена на рис. 1. После короткого периода инкубации при 65 °C, необходимого для денатурации РНК-мишени, специфический праймер (P1) гибридизуется с РНК. Кроме последовательности, комплементарной РНК-мишени, этот праймер содержит также промоторную последовательность T7 РНК-полимеразы. При температуре 41 °C AMV-ревертаза удлинит этот праймер, создавая ДНК-копию с РНК-

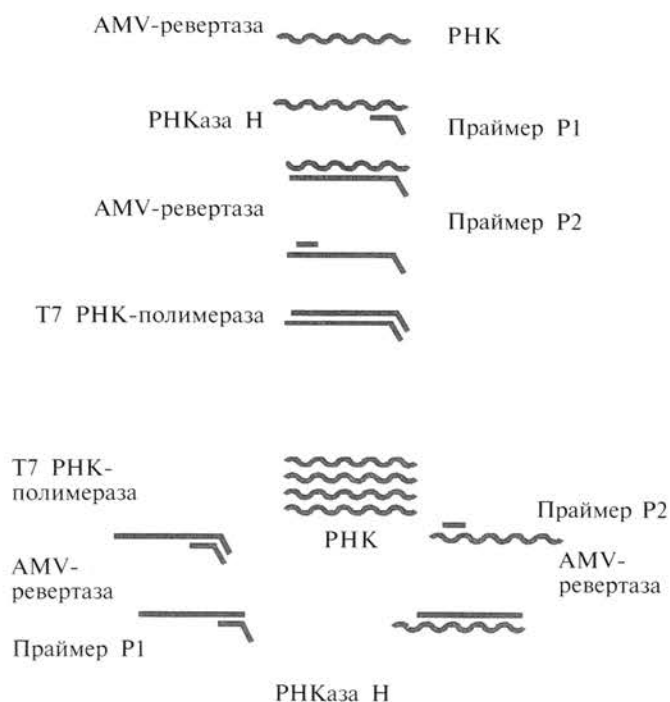


Рис. 1. Схема реакции NASBA

матрицы и формируя гибрид РНК/кДНК. РНКазы Н воспринимают этот гибрид как субстрат и гидролизуют РНК, оставляя одонитевую ДНК, с которой гибридизуется второй праймер (Р2). В результате удлинения этого праймера АМВ-ревертазой до 5'-конца кДНК формируется двунитевая ДНК, что приводит промотор Т7 РНК-полимеразы в функциональное состояние. Распознавая свой промотор, Т7 РНК-полимераза производит множество копий РНК, комплементарных исходной последовательности РНК. После этой «линейной» фазы, NASBA вступает в «циклическую» фазу. Праймер Р2 гибридизуется с вновь синтезированной молекулой РНК, и, по мере удлинения этого праймера, РНКазы Н расщепляют РНК часть образующегося гибрида РНК/кДНК. Затем праймер Р1 связывается с кДНК, после чего АМВ-ревертаза удлиняет его, а Т7 РНК-полимераза синтезирует новую РНК, запуская тем самым новый цикл. Данный механизм обеспечивает продукцию множества копий РНК с РНК-мишени.

Первоначально предполагалось, что в тех условиях, которые используются для амплификации РНК, ДНК не может служить мишенью в реакции NASBA, потому главным образом, что двунитевая ДНК не денатурируется при температуре 65 °С. Для того, чтобы ДНК могла служить мишенью в реакции NASBA, в начале анализа проводят два дополнительных шага денатурации ДНК при 95 °С. ДНК может амплифицироваться в реакции NASBA без введения до-

полнительных шагов денатурации, если праймеры подбираются либо к участкам ДНК с низкой температурой плавления, либо к одонитевым фрагментам ДНК. В этих условиях амплификация ДНК возможна, но только в случае отсутствия соответствующей последовательности РНК или существенного преобладания (>1000) ДНК над РНК.

Таким образом, правильный выбор условий реакции обеспечивает NASBA уникальной способностью избирательно амплифицировать специфическую последовательность РНК в присутствии идентичной последовательности ДНК, входящей в состав двунитевой молекулы.

Основные этапы анализа

Анализ биологического материала с использованием метода NASBA состоит из трех основных этапов:

- выделение нуклеиновых кислот;
- амплификация специфического фрагмента РНК/ДНК;
- анализ продуктов амплификации.

Для выделения нуклеиновых кислот в настоящее время широко применяется метод, впервые описанный R. Voorn и соавт. [4]. В основе метода лежит сорбция нуклеиновых кислот частицами диоксида кремния (силики) в присутствии хаотропного агента гуанидина изотиоцианата (GuSCN) высокой концентрации. Денатурирующие свойства GuSCN обеспечивают лизис клеток, эукариотических и бактериальных, и вирусных частиц, а также инактивацию РНКаз и ДНКаз, присутствующих в биологическом материале. Кроме того, благодаря нескольким отмывочным шагам, в ходе процедуры удаляются потенциальные ингибиторы реакции [15]. Метод успешно используется для выделения нуклеиновых кислот из цельной крови, плазмы, слюны, мочи, спинномозговой жидкости, генитальных мазков и другого клинического материала [27, 34].

При выборе праймеров для реакции NASBA руководствуются рядом правил, которые приведены в работах B. Deiman и соавт. и R. Sooknana и соавт. [9, 35].

До проведения этапа денатурации готовят реакционную смесь, в которую входят все компоненты реакции, кроме ферментов. Состав реакционной смеси, условия реакции и этапы ее оптимизации приводятся в работе D. van Strijp и соавт. [36]. После денатурации мишени и ее гибридизации с праймером Р1 в реакционную смесь добавляется смесь ферментов. Амплификация протекает при температуре 41 °С в течение 1–2 часов; кинетика

реакции в основном определяется эффективностью связывания праймеров. С разработкой стандартного базового набора NucliSens Basic Kit (Organon Teknika), в состав которого входят все реагенты, кроме специфических праймеров и зондов, оптимизация анализа и его процедура существенно упростилась.

Последний этап процедуры анализа — детекция продуктов NASBA. Однонитевая РНК, амплифицируемая в ходе реакции, является очень удобным материалом для реализации гибридизационных схем детекции. В литературе описано несколько методов анализа РНК-ампликонов с помощью олигонуклеотидных зондов. Так, В.М. Darke и соавт. [8] применили методику «enzyme linked gel assay» (ELGA), в которой используются олигонуклеотиды, меченые пероксидазой хрена. Свободные и связавшиеся с ампликонами зонды разделяют методом электрофореза в геле, содержащем сульфат декс-трона, после чего их можно визуализировать путем инкубации геля с субстратом пероксидазы хрена. F. Oehlschlager и соавт. для детекции продуктов NASBA успешно применили зонды, меченые флуоресцентными красителями [30]. Однако самое широкое распространение получила электрохемилюминисцентная детекция (ECL — *electrochemiluminiscent*) — методика, в которой используются олигонуклеотидные зонды, меченые хелатом рутения [11]. Так, в коммерческой системе NucliSens Basic Kit (Organon Teknika) для реализации ECL-формата детекции используются два олигонуклеотидных зонда. Один из зондов (зонд «захвата»), комплементарный последовательности ампликона, метят биотином и прикрепляют к магнитным частицам, покрытым стрептавидином. Второй зонд (ECL-зонд), меченый хелатом рутения, является общим для всех ампликонов, так как он комплементарен нуклеотидной последовательности, добавленной к 3'-концу праймера Р2 и одинаковой для всех праймеров. Индуцируемая электрическим напряжением окислительно-восстановительная реакция приводит к возникновению электрохемилюминисцентного сигнала, который усиливается, а затем регистрируется фотоумножителем.

Основное направление развития метода NASBA, как и всех молекулярных диагностических методов, — стандартизация и автоматизация процедуры анализа в целях повышения эффективности его использования в рутинной лабораторной диагностике. С тех пор как метод NASBA был впервые описан, этап детекции продуктов реакции постоянно совершенствовался, однако все предложенные методики требовали значительных затрат труда, времени и/или использования дополнительных дорогостоящих приборов. Недавно для

детекции продуктов NASBA была применена технология молекулярных биконов (*beacon* — сигнал, маяк), которая широко используется в современной модификации ПЦР-анализа — ПЦР в реальном времени. Молекулярный бикон представляет собой олигонуклеотидный зонд, к 5'-концу которого присоединен флюорофор, а к 3'-концу — «гаситель». Первые 6–7 нуклеотидов зонда комплементарны последним 6–7 нуклеотидам, а внутренняя последовательность комплементарна ампликону. В отсутствие мишени нуклеотидная последовательность 3'-конца гибридизуется с последовательностью 5'-конца, образуя так называемый «стебель», после чего флюорофор и «гаситель» оказываются в непосредственной близости друг от друга, и энергия, выделяемая флюорофором, поглощается «гасителем». В присутствии мишени внутренняя последовательность бикона, образующая «петлю», гибридизуется с ней, зонд «раскрывается», в результате чего флюорофор и «гаситель» удаляются друг от друга, а испускаемый флюорофором свет регистрируется прибором (рис. 2). Увеличение флуоресценции, отражающее динамику накопления продуктов реакции, отображается на дисплее прибора: таким образом, детекция ампликонов осуществляется по мере их накопления в режиме реального времени. Отсутствие этапа детекции существенно укорачивает время анализа и снижает риск контаминации. Кроме того, NASBA в реальном времени позволяет точно и быстро определить количество копий мишени в клинической пробе. Так, для количественного анализа мишени в ECL-формате используются 3 калибратора — фрагмента РНК, фланкируемых теми же праймерами, но имеющих отличную от мишени внутреннюю последовательность, — каждый из которых добавляется в реакционную смесь в определенной концентрации. После амплификации проводится гибридизация с 4 различными зондами (один зонд комплементарен исследуемой матрице, остальные — калибраторам), и по ECL-сигналам калибраторов рассчитывается исходная концентрация мишени [11, 26]. При использовании молекулярных биконов необходим только один калибратор — ампликон

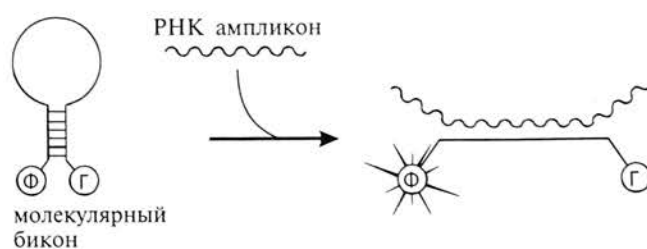


Рис. 2. Схема действия молекулярного бикона: Ф — флюорофор, Г — «гаситель»

лификация и детекция исследуемой матрицы и калибратора осуществляются одновременно, после чего кинетика обеих реакций используется для расчета концентрации мишени [40].

Впервые применение молекулярных биконов для анализа продуктов NASBA было описано G. Leone и соавт. [22]. С тех пор данный подход был успешно применен для выявления РНК-вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [1], цитомегаловируса (ЦМВ) [13], вируса папилломы человека (ВПЧ) [7].

Области применения

С помощью метода NASBA можно амплифицировать различные виды РНК: мРНК, рРНК, а также геномную РНК РНК-содержащих вирусов. Основными областями применения этого метода являются диагностика инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами, изучение экспрессии бактериальных и вирусных генов, а также диагностика бактериальных и грибковых инфекций, которая основана на выявлении 16S и 18S рРНК, соответственно.

Применение метода NASBA для диагностики ВИЧ впервые было описано в 1994 году, и уже в 1995 году появилась первая коммерческая тест-система для выявления и количественной оценки РНК ВИЧ методом NASBA [11]. Дальнейшее развитие метода привело к созданию тест-системы второго поколения, позволяющей с высокой точностью определить количество вируса в очень широком диапазоне концентраций — от 25 до 5×10^6 копий РНК в 1 мл плазмы крови [29]. Наконец, применение технологии молекулярных биконов позволило создать тест-систему, с помощью которой можно провести количественный анализ РНК ВИЧ в 48 пробах в течение 90 минут [1].

Очень широко применяется метод NASBA и для диагностики гепатита С (ВГС). F. Lunel и соавт. [24], сравнивая три коммерческие тест-системы для количественного определения РНК ВГС, использующие методы ОТ-ПЦР (Amplicor HCV Monitor, Roche), NASBA (NASBA HCV, Organon) и метод амплификации сигнала bDNA (branched DNA) (Quantiplex HCV RNA, Chiron), показали, что самой высокой чувствительностью обладал метод NASBA (99 % при 94 % для ОТ-ПЦР и 88 % для bDNA). Что касается воспроизводимости результатов, то метод ОТ-ПЦР уступал методам NASBA и bDNA. Возможности применения NASBA для количественного анализа ВГС с одновременным определением его генотипа были продемонстрированы R. Melsert и соавт. [26]. В качестве примеров использования NASBA

для диагностики других РНК-содержащих вирусов можно привести выявление вируса парагриппа [16], ротавируса [18] и энтеровирусов [10, 21].

Экспрессия некоторых генов клинически значимых вирусов может служить специфическим индикатором их репликации и использоваться в диагностических целях. Так, по мнению многих авторов, экспрессия предранних генов ЦМВ в лейкоцитах крови может рассматриваться как первый признак активной цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ), хотя выявление транскриптов предранних генов не всегда предсказывает клинически значимую инфекцию. В то же время экспрессия поздних генов ЦМВ может прогнозировать диссеминацию вируса и развитие заболевания [3, 12, 14, 31]. Для выявления транскриптов позднего гена ЦМВ UL65, кодирующего капсидный белок pp67, методом NASBA была разработана коммерческая тест-система (NucliSence CMV pp67, Organon Teknika), с помощью которой диагностировали клинически значимую ЦМВИ у пациентов, перенесших трансплантацию различных органов и костного мозга [3, 12], а также пациентов, инфицированных ВИЧ [41]. Перспективы использования метода NASBA для диагностики врожденной ЦМВИ обрисовали M. Revello и соавт. [32, 33]. Они показали, что определение транскриптов предраннего гена IE1 ЦМВ в лейкоцитах крови может служить методом ранней диагностики первичной ЦМВИ у беременных женщин и врожденной ЦМВИ у новорожденных детей [32]. Так, IE1 мРНК была выявлена в 100, 75, 36,3 и 22 % образцов крови, полученных от беременных женщин через 1, 2, 3 и 4–6 месяцев после инфицирования ЦМВ, соответственно. Ни у одной женщины с первичной ЦМВИ по истечении 6 месяцев после инфицирования транскрипты гена IE1 не выявлялись. У новорожденных детей с врожденной ЦМВИ IE1 мРНК была обнаружена в 100 % образцов крови, собранных через 1–7 дней после рождения (в среднем через 1,5 дня), и в 46,4 % образцов крови, собранных через 27–260 дней после рождения (в среднем через 88 дней). При обследовании контрольной группы, состоящей из женщин с рецидивирующей ЦМВИ или ЦМВИ, перенесенной задолго до беременности, а также неинфицированных новорожденных детей, транскрипты гена IE1 не выявлялись. В более поздней работе эти авторы представили анализ данных, полученных при пренатальной диагностике ЦМВИ у 102 женщин с первичной инфекцией [33]. Образцы амниотической жидкости и крови плода были исследованы методами культуры клеток, ПЦР, NASBA, и, кроме того, кровь плода была протестирована на наличие антигенов ЦМВ и иммуно-

глобулинов класса М. Диагностические характеристики методов оценивались по отношению к врожденной ЦМВИ, диагностированной при рождении. В то время как все методы обладали очень высокой специфичностью и прогностической значимостью положительных результатов, чувствительность и прогностическая значимость отрицательных результатов сильно варьировала. Самые высокие показатели чувствительности были получены при выявлении ДНК-вируса в амниотической жидкости методом ПЦР (90,2 %) и РНК — методом NASBA (90,9 и 90,3 % для мРНК генов IE1 и UL65, соответственно), самые низкие — при определении иммуноглобулинов класса М в крови плода (52,5 %) и выделении вируса из крови плода в культуре клеток (38,2 %). В соответствии с этим распределились и показатели прогностической значимости отрицательных результатов: при выявлении ДНК ЦМВ в амниотической жидкости методом ПЦР данный показатель равнялся 90,4 %, при выявлении мРНК генов IE1 и UL65 методом NASBA — 93,2 и 93,3 %, соответственно, при определении IgM в крови плода — 69,3 % и выделении вируса из крови плода в культуре клеток — 64,4 %. Результаты работы позволили авторам заключить, что анализ мРНК как преданных (IE1), так и поздних (UL65) генов ЦМВ с помощью NASBA в амниотической жидкости является надежным методом пренатальной диагностики ЦМВИ и может использоваться для подтверждения результатов ПЦР, особенно в случае отсутствия возможностей для культивирования вируса [33].

Применение метода NASBA для изучения экспрессии онкогенных белков Е6 и Е7 вируса папилломы человека (ВПЧ) описано в работах I. Kraus и соавт. [20] и К. Cuschieri и соавт. [7]. I. Kraus и соавт. исследовали на наличие ДНК ВПЧ и мРНК генов Е6 и Е7 ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 18, 31, 33, 45, 52 и 58 типов) 190 биопсийных проб из цервикального канала, полученных от женщин с дисплазией шейки матки, которым было назначено оперативное лечение методом конизации шейки [20]. Они показали, что частота выявления ДНК и РНК ВПЧ увеличивалась со степенью дисплазии, и практически во всех случаях дисплазии высокой степени были выявлены транскрипты генов Е6 и Е7 ВПЧ. В работе К. Cuschieri и соавторов было показано, что выявление транскриптов генов Е6 и Е7 онкогенных типов ВПЧ в клиническом материале ассоциировано с повышенным риском цервикальной неопластической прогрессии, и персистенция РНК вируса может быть лучшим прогностическим индикатором, чем персистенция ДНК [7]. Они наблюдали течение папилло-

мавирусной инфекции (ПВИ), установленной по наличию ДНК ВПЧ, у 54 женщин с неизменной морфологией эпителиальных клеток шейки матки в начале наблюдения. Через два года материал от этих женщин снова исследовали на ДНК ВПЧ. Кроме того, материал, полученный в обеих временных точках, с помощью NASBA проанализировали на наличие мРНК генов Е6 и Е7 ВПЧ 16, 18, 31, 35 и 45 типов. У 11 из 54 женщин (20 %) за два года развились диспластические изменения. Результаты генотипирования ВПЧ показали, что у 31 из 54 (57 %) женщин имела место транзиторная ПВИ, тогда как у 23 женщин (43 %) наблюдалась типоспецифическая персистенция вируса, и в этих случаях вероятность развития дисплазии эпителия шейки матки была значительно выше ($P = 0,001$), чем в случаях транзиторной ПВИ. Кроме того, если транскрипты генов Е6 и Е7 были обнаружены уже в начале наблюдения, вероятность персистенции вируса была значительно выше ($P = 0,013$), чем в тех случаях, когда в начале наблюдения обнаруживали только ДНК ВПЧ. Авторы работы подчеркнули важность определения типоспецифической персистенции ПВИ для выявления женщин с повышенным риском развития диспластических изменений эпителия шейки матки. В качестве инструмента, по мнению авторов, может использоваться анализ ДНК ВПЧ с последующим генотипированием, проводимый через определенные промежутки времени. Альтернативным методом может служить выявление Е6/Е7 мРНК с помощью NASBA — в этом случае исследование может выполняться в одной временной точке.

По сравнению с методом ОТ-ПЦР, который широко используется для диагностики РНК-вирусов и изучения экспрессии генов, метод NASBA обладает рядом преимуществ. По данным разных авторов, чувствительность NASBA превышает чувствительность ОТ-ПЦР в 10–100 раз [17, 39]. Принцип метода NASBA таков, что амплифицируется только РНК; «фоновая» ДНК может служить мишенью только при определенных условиях, о которых говорилось выше. Этим определяется важнейшее преимущество NASBA в области детекции и количественного анализа РНК: нет необходимости синтезировать кДНК и производить обработку ДНКазой для удаления «фоновой» ДНК, а также контролировать эффективность этих процессов.

Так как в активно размножающихся микроорганизмах 16S рРНК присутствует в большом количестве, она является идеальной мишенью для ранней диагностики бактериальных инфекций. Особенно эффективно применение NASBA для выявления бактериальных патогенов, куль-

тивирование которых связано с серьезными затратами труда и времени, таких как *Chlamydia trachomatis* [25, 27], *Neisseria gonorrhoeae* [25], *Chlamydia pneumoniae* [6], *Mycoplasma pneumoniae* [23], *Campylobacter jejuni* [37], различные виды микобактерий [38]. С. Морге и соавт. [28] при анализе материала от пациентов, получавших лечение доксициклином по поводу генитальной хламидийной инфекции, методами культуры клеток, ПЦР и NASBA пришли к выводу, что NASBA может применяться вместо культурального метода для оценки эффективности антимикробной терапии. Они исследовали цервикальные соскобы и пробы мочи, которые были получены от 25 женщин до лечения и в разные сроки (до 5 недель) после лечения. При анализе цервикальных соскобов 16S рРНК *C. trachomatis* была обнаружена во всех пробах до лечения и только в двух пробах, взятых через неделю после окончания лечения. В пробах, полученных через 2 недели после лечения и более, РНК хламидий не выявлялась. В противоположность этому ДНК хламидий была обнаружена в 21 из 25, в 6 из 21 и в 5 из 20 проб, полученных через одну, две и три недели после окончания лечения, соответственно. У 15 пациенток были взяты также пробы мочи. РНК хламидий была обнаружена во всех пробах до лечения, и только в одной из 15 проб, полученных через неделю после лечения, тогда как ДНК — в 4 из 15 проб. Ни ДНК, ни РНК хламидий не выявлялись в пробах мочи, полученных через две недели и более после окончания лечения. По сравнению с культуральным тестом NASBA обладает более высокой чувствительностью, и к тому же анализ методом NASBA занимает гораздо меньше времени.

Способность обнаруживать только жизнеспособные организмы определяет основное преимущество NASBA перед ПЦР при использовании ее в диагностике бактериальных и грибковых инфекций [2, 19]. Кроме того, так как в нормально развивающихся организмах содержание рРНК очень высоко, то в отдельных случаях чувствительность NASBA может превышать чувствительность ПЦР [27].

Учитывая, каким потенциалом обладает технология NASBA для применения в области молекулярной диагностики инфекций, в том числе инфекций, значимых для акушерства и гинекологии, можно утверждать, что в недалеком будущем этот метод займет достойное место в арсенале диагностических средств современной микробиологической лаборатории.

Литература

1. Van Beuningen R., Marras S.A., Kramer F.R. et al. Development of a high throughput detection system for HIV-1 using real-time NASBA based on molecular beacons // Proceedings of SPIE-2001. — Vol. 4264. — P. 66–72.
2. Birch L., Dawson C.E., Cornett J.H., Keer J.T. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability // Letters Appl. Microbiol. — 2001. — Vol. 33. — P. 296–301.
3. Blok M.J., Goossens V.J., van Herle S. J. et al. Diagnostic value of monitoring of human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal allograft recipients by nucleic acid sequence-based amplification // J. Clin. Microbiol. — 1998. — Vol. 36. — P. 1341–1346.
4. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Hansen C.L. et al. Rapid and simple method for the purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28. — P. 495–503.
5. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification // Nature. — 1991. — Vol. 350. — P. 91–92.
6. Coombes B.K., Mahony J.B. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) of *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein (ompA) mRNA with bioluminescent detection // Comb. Chem. High Throughput. Screen. — 2000. — Vol. 3. — P. 315–327.
7. Cuschieri K.S., Whitley M.J., Heather A.C. Human papillomavirus type specific DNA and RNA persistence — implications for cervical disease progression and monitoring // J. Med. Virol. — 2004. — Vol. 73. — P. 65–70.
8. Darke B.M., Jackson S.K., Hanna S.M., Fox J.D. Detection of human TNF- α mRNA by NASBA // J. Immunol. Methods. — 1998. — Vol. 212. — P. 19–28.
9. Deiman B., van Aarle P., Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) // Mol. Biotech. — 2002. — Vol. 20. — P. 163–179.
10. Fox J.D., Han S., Samuelson A. et al. Development and evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) for diagnosis of enterovirus infections using NucliSens Basic Kit // J. Clin. Virol. — 2002. — Vol. 24. — P. 117–130.
11. Van Gemen B., van Beuningen R., Nabbe A., van Strijp D. et al. A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labeled probes // J. Virol. Methods. — 1994. — Vol. 49. — P. 157–168.
12. Gerna G., Baldanti F., Middeldorp J.M. et al. Clinical significance of expression of human cytomegalovirus pp67 late transcripts in heart, lung, and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37. — P. 902–911.
13. Greijer A.E., Adriaanse H.M.A., Dekkers C.A.J., Middeldorp J.M. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA // J. Clin. Virol. — 2002. — Vol. 20. — P. 57–66.
14. Greijer A.E., Verschuuren E.A.M., Harmsen M.C. et al. Direct quantification of human cytomegalovirus immediate-early and late mRNA levels in blood of lung transplant recipients by competitive nucleic acid sequence-based amplification // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39. — P. 251–259.
15. Hale A.D., Green J., Brown D.W.J. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round viruses in faecal specimens // J. Virol. Methods. — 1996. — Vol. 57. — P. 195–201.
16. Hibbitts S., Rahman A., John R. et al. Development and evaluation of NucliSens basic kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'real-time' detection // J. Virol. Methods. — 2003. — Vol. 108. — P. 45–155.
17. Jean J., Blais B., Darveau A., Fliss I. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based

- amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 5593–5600.
18. Jean J., Blais B., Darveau A., Fliss I. Rapid detection of human rotavirus using colorimetric nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)-enzyme-linked immunosorbent assay in sewage treatment effluent // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2002. — Vol. 23. — P. 143–147.
 19. Keer J.T., Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability // *J. Microbiol. Methods.* — 2003. — Vol. 53. — P. 175–183.
 20. Kraus J., Molden T., Erno L.E. et al. Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones // *Brit. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 90. — P. 1407–1413.
 21. Landry M.L., Garner R., Ferguson D. Rapid enterovirus RNA detection in clinical specimens by using nucleic acid sequence-based amplification // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 346–350.
 22. Leone G., van Schijndel H., van Gemen B. et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA // *Nucleic Acids Res.* — 1998. — Vol. 26. — P. 2150–2156.
 23. Loens K., Ieven M., Ursi D. et al. Application of NucliSens Basic Kit for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens // *J. Microbiol. Methods.* — 2003. — Vol. 54. — P. 127–130.
 24. Lunel F., Cresta P., Vitour D. et al. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and monitor assay // *Hepatology.* — 1999. — Vol. 29. — P. 528–535.
 25. Mahony J.B., Song X., Chong S. 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. — Vol. 39. — P. 1429–1435.
 26. Melsert R., Damen M., Cuyper T. et al. Combined quantitation and genotyping of hepatitis C virus RNA using NASBA // *Hepatitis C virus: genetic heterogeneity and viral load.* — Paris: John Libbey Eurotext, 1997. — P. 79–88.
 27. Morre S., Sillekens P., Jacobs M.V. et al. RNA amplification by nucleic acid sequence-based amplification with an internal standard enables reliable detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapings and urine samples // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — Vol. 34. — P. 3108–3114.
 28. Morre S.A., Sillekens P.T.G., Jacobs M.V. et al. Monitoring of *Chlamydia trachomatis* infections after antibiotic treatment using RNA detection by nucleic acid sequence-based amplification // *J. Clin. Pathol.* — 1998. — Vol. 51. — P. 149–154.
 29. Notermans D.W., de Wolf F., Oudshoorn P. et al. Evaluation of a second-generation nucleic acid sequence-based amplification assay for quantification of HIV type 1 RNA and the use of ultra-sensitive protocol adaptations // *AIDS Res. Human Retroviruses.* — 2000. — Vol. 16. — P. 1507–1517.
 30. Oehlenschlaeger F., Schwille P., Eigen M. Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 12811–12816.
 31. Oldenburg N., Lam K.M.C., Khan M.E. et al. Evaluation of human cytomegalovirus gene expression in thoracic organ transplant recipients using nucleic acid sequence-based amplification // *Transplantation.* — 2000. — Vol. 70. — P. 1209–1215.32.
 32. Revello M.G., Lilleri D., Zavattoni M. et al. Human cytomegalovirus immediate early messenger RNA in blood of pregnant women with primary infection and of congenitally infected newborns // *J. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 184. — P. 1078–1081.
 33. Revello M.G., Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection // *J. Clin. Virol.* — 2004. — Vol. 29. — P. 71–83.
 34. Shepard R.N., Schock J., Robertson K. et al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in different biological compartments // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 1414–1418.
 35. Sooknanan R., van Gemen B., Malek L. Nucleic acid sequence-based amplification // *Molecular methods for virus detection*—London: Academic press, 1995. — P. 261–285.
 36. Van Strijp D., van Aarle P. NASBA: a method for nucleic acid diagnostics // *Methods in molecular medicine*—Totowa, NJ: Humana press, 1995. — P. 331–340.
 37. Uyttendaele M., Bastiaansen A., Debevere J. Evaluation of the NASBA nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni* // *Int. J. Food Microbiol.* — 1997. — Vol. 37. — P. 13–20.
 38. Van der Vliet G., Schukink R.A.F., van Gemen B. et al. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of *Mycobacteria* // *J. Gen. Microbiol.* — 1993. — Vol. 139. — P. 2423–2429.
 39. Wacharapluesadee S., Hemachudha T. Nucleic-acid sequence based amplification in the rapid diagnosis of rabies // *Lancet.* — 2001. — Vol. 358. — P. 892–893.
 40. Weusten J., Carpay W., Oosterlaken T. et al. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence-based amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — e26.
 41. Zhang F., Tetali S., Wang X.P. et al. Detection of cytomegalovirus pp67 late gene transcripts in cerebrospinal fluids of human immunodeficiency virus type 1-infected patients by nucleic acid sequence-based amplification // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 1920–1925.

NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION (NASBA) AND ITS APPLICATION IN OBSTETRICAL AND GYNECOLOGICAL PRACTICE

Shipitsyna E.V., Budilovskaya O.V., Savitcheva A.M.

■ **Summary:** Method of isothermal amplification of nucleic acids NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) is becoming widely used in diagnostic molecular microbiology including diagnostics of infections in pregnant women and newborn infants. NASBA method possesses the unique ability to amplify RNA target selectively in the presence of DNA target of identical sequence, which determines its main application areas: diagnosis of RNA viruses, investigation of bacterial and viral gene expression, diagnosis of bacterial infections based on 16S rRNA detection. In the article the principle and the main steps of the method as well as some applications in diagnostic microbiology are reviewed. In addition, a comparative evaluation of NASBA and other amplification techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) is presented.

■ **Key words:** nucleic acid sequence-based amplification; RNA; transcription; diagnostics of bacterial and viral infections