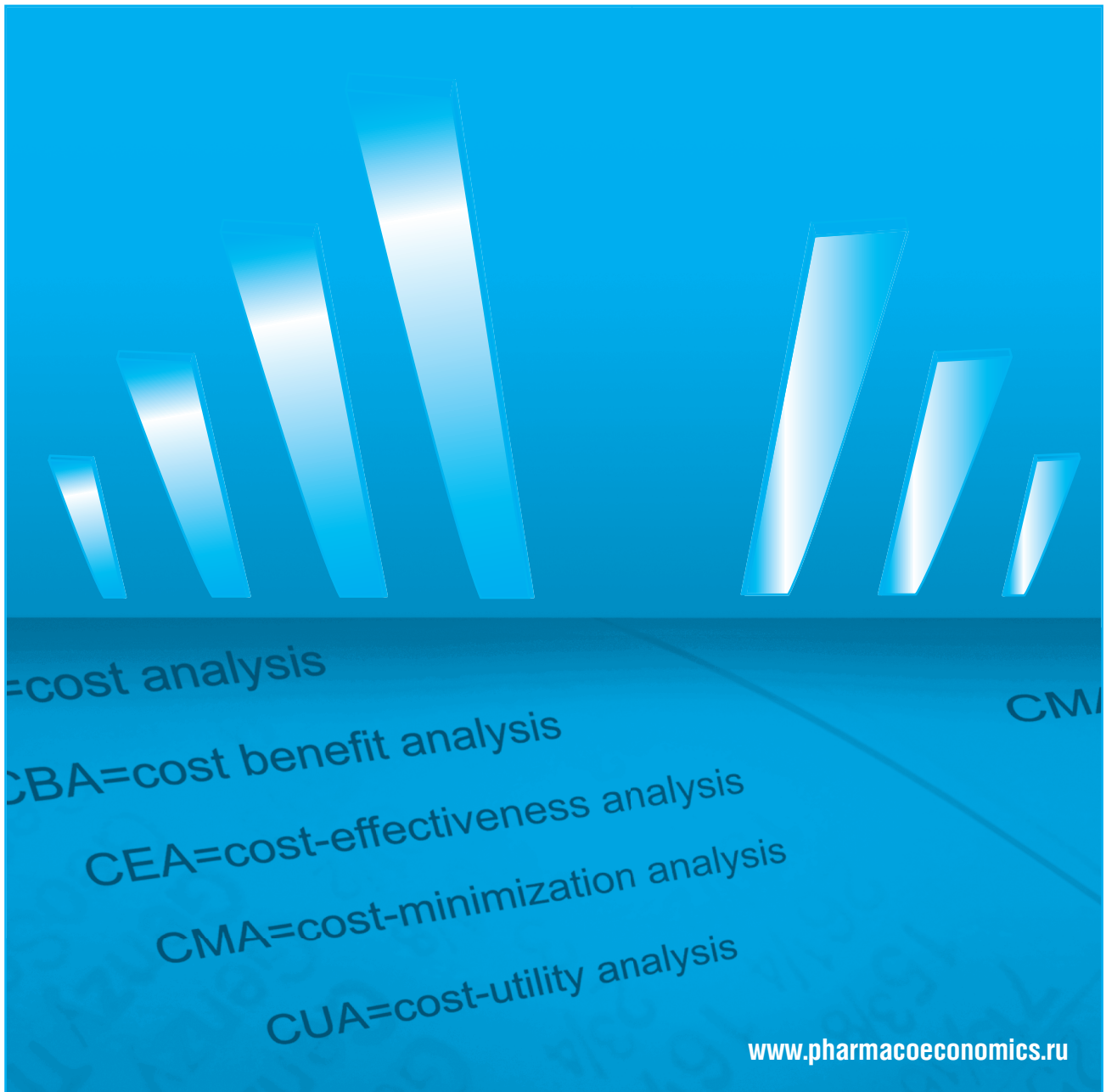


Фармакоэкономика

Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология



Данная интернет-версия статьи была скачана с сайта <https://www.pharmacoeconomics.ru>. Не предназначено для использования в коммерческих целях.
Информация о репринтах можно получить в редакции. Тел.: +7 (495) 649-54-95; эл. почта: info@irbis-1.ru

FARMAKOEkONOMIKA

Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology

2022 Vol. 15 No. 2

№2

Том 15

2022



<https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.111>

ISSN 2070-4909 (print)

ISSN 2070-4933 (online)

Клинические испытания набора реагентов для определения рибонуклеиновых кислот коронавируса нового типа (SARS-CoV-2) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени

Дмитрюкова М.Ю.¹, Голод А.А.¹, Сенина М.Е.¹, Гуцин А.Е.^{2,3}

¹ Общество с ограниченной ответственностью «НекстБио» (ул. Полимерная, д. 8, Москва 111394, Россия)

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы (Ленинский пр-т, д. 17, Москва 119071, Россия)

³ Общество с ограниченной ответственностью «ИнтерЛабСервис» (ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2, Москва 115035, Россия)

Для контактов: Дмитрюкова Марина Юрьевна, e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

РЕЗЮМЕ

Цель: разработка и валидация набора реагентов для качественного определения рибонуклеиновых кислот (РНК) коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени, адаптированной для использования совместно с наборами для экстракции РНК в автоматическом режиме.

Материал и методы. Оценку клинических свойств набора проводили на биологическом материале (мазки со слизистой рото- и носоглотки, мокрота), полученном в ходе лечебно-диагностического процесса. Наличие или отсутствие РНК коронавируса нового типа было подтверждено с помощью набора сравнения. Чувствительность набора определяли с использованием стандартного образца SARS-CoV-2 (EDX SARS-CoV-2 Standard, Bio-Rad Laboratories, США).

Результаты. Выявление коронавируса нового типа проводится по двум участкам генома SARS-CoV-2. По результатам исследования, чувствительность относительно стандартного образца составила 250 копий/мл. Коэффициент вариации полученных значений для образца с концентрацией 104 копии/мл не превышал 5% при тестировании в различных условиях. Диагностическая чувствительность относительно набора сравнения составила 100% (95% доверительный интервал (ДИ) 95,6–100) для мазков из рото- и носоглотки и 100% (95% ДИ 94,8–100) для мокроты. Диагностическая специфичность – 100% (95% ДИ 95,6–100) для мазков из рото- и носоглотки и 100% (95% ДИ 94,8–100) для мокроты. Длительность полного исследования с момента экстракции РНК до получения результата с использованием станции для экстракции РНК составила 3 ч при тестировании 96 образцов.

Заключение. Использование набора реагентов совместно с автоматическими станциями позволяет значительно ускорить проведение анализа и снизить нагрузку на лаборатории в условиях пандемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, рибонуклеиновые кислоты, РНК, полимеразно-цепная реакция, ПЦР.

Статья поступила: 29.09.2021 г.; в доработанном виде: 08.06.2022 г.; принята к печати: 30.06.2022 г.

Конфликт интересов

М.Ю. Дмитрюкова, А.А. Голод и М.Е. Сенина являются сотрудниками ООО «НекстБио».

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Для цитирования

Дмитрюкова М.Ю., Голод А.А., Сенина М.Е., Гуцин А.Е. Клинические испытания набора реагентов для определения рибонуклеиновых кислот коронавируса нового типа (SARS-CoV-2) методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* 2022; 15 (2): 230–236. <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.111>.

Clinical study of real-time polymerase chain reaction test kit for SARS-CoV-2 ribonucleic acids detection

Dmitryukova M.Yu.¹, Golod A.A.¹, Senina M.E.¹, Gushchin A.E.^{2,3}

¹ NextBio LLC (8 Polimernaya Str., Moscow 111394, Russia)

² Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenerology and Cosmetology (17 Leninskiy Ave, Moscow 119071, Russia)

³ InterLabService LLC (20/13 bldg 2 Sadovnicheskaya Str., Moscow 115035, Russia)

Corresponding author: Marina Yu. Dmitryukova, e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

SUMMARY

Objective: development and validation of a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test kit for SARS-CoV-2 ribonucleic acids (RNA) qualitative detection adapted for using with automated station for RNA extraction.

Material and methods. Assessment of clinical performance was carried out on biological samples (nasal and oropharyngeal swabs and sputum) obtained during the diagnostic procedure. The presence of novel coronavirus RNA was established using a reference kit. Sensitivity was evaluated on standard SARS-CoV-2 sample (EDX SARS-CoV-2 Standard, Bio-Rad Laboratories, USA).

Results. Presence of SARS-CoV-2 RNA is detected by two genome regions. Sensitivity determined by testing SARS-CoV-2 standard was 250 copies/ml. Coefficient of variation during the testing of samples with the concentration of 104 copies/ml did not exceed 5% in different conditions. Diagnostic sensitivity against reference test was 100% (95% confidence interval (CI) 95.6–100) for nasal and oropharyngeal swabs and 100% (95% CI 94.8–100) for sputum. Diagnostic specificity was 100% (95% CI 95.6–100) for nasal and oropharyngeal swabs and 100% (95% CI 94.8–100) for sputum. The turnaround time for test from RNA extraction till obtaining results was about 3 hours when testing 96 samples using automated stations for RNA extraction.

Conclusion. Using the kit together with automated station for RNA extraction will increase laboratory testing capacity in pandemic conditions.

KEYWORDS

Novel coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, ribonucleic acids, RNA, polymerase chain reaction, PCR.

Received: 29.09.2021; **in the revised form:** 08.06.2022; **accepted:** 30.06.2022

Conflict of interests

M.Yu. Dmitryukova, A.A. Golod and M.E. Senina are the employees of NextBio LLC.

Authors' contribution

The authors contributed equally to this article.

For citation

Dmitryukova M.Yu., Golod A.A., Senina M.E., Gushchin A.E. Clinical study of real-time polymerase chain reaction test kit for SARS-CoV-2 ribonucleic acids detection. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology*. 2022; 15 (2): 230–236 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.111>.

Основные моменты

Что уже известно об этой теме?

- ▶ Пандемия COVID-19 требует увеличения числа тестирований, в т.ч. проведения анализа полимеразно-цепной реакции (ПЦР). На начало ноября 2021 г. в России количество ПЦР-исследований составило более 430 тыс. в день, из них более 40 тыс. были положительными
- ▶ Молекулярные методы диагностики являются основным подтверждающим методом наличия инфекции SARS-CoV-2
- ▶ Валидация тестов, применяемых в клинической практике, является неотъемлемой частью процесса производства наборов реагентов для молекулярной диагностики

Что нового дает статья?

- ▶ Разработан и валидирован набор реагентов для выявления SARS-CoV-2, совместимый с автоматическими станциями для экстракции нуклеиновых кислот

Как это может повлиять на клиническую практику в обозримом будущем?

- ▶ Применение автоматических станций позволяет значительно увеличить пропускную способность лаборатории при проведении ПЦР-исследований, снизить количество ошибок в процессе анализа и в конечном итоге увеличить скорость получения результата, что крайне важно на фоне пандемии COVID-19

Highlights

What is already known about the subject?

- ▶ The COVID-19 pandemic requires an increase in the number of tests, including PCR. By November 2021, in Russia, the rate of PCR testing was 430 thousand a day, 40 thousand of them showed positive results
- ▶ Molecular methods of diagnostics are the main methods that are used to verify the presence of SARS-Cov-2 infection
- ▶ Validation of tests used in clinical practice is an integral part of the process of reagent kit production for molecular diagnostics

What are the new findings?

- ▶ A reagent kit for SARS-CoV-2 detection compatible with automated stations for nucleic acids extraction was developed and validated

How might it impact the clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ The use of automated stations allows to significantly increase a laboratory capacity in PCR testing, decrease the rate of mistakes during the analysis, and accelerate the time of results obtaining, which is extremely important during COVID-19 pandemic

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Коронавирус второго типа, вызывающий тяжелый респираторный синдром и впервые выявленный в конце 2019 г., относится к семейству *Coronaviridae*, широко распространенному в среде млекопитающих. До 80% случаев инфекции SARS-CoV-2 протекают бессимптомно [1–3], при этом носители могут заражать других лиц [4].

Симптомы COVID-19 часто схожи с проявлениями других респираторных инфекций, потому необходимы высокоспецифичные и чувствительные методы, позволяющие проводить дифференциальную диагностику. Основным методом этиологической диагностики как острых респираторных вирусных инфекций, так и COVID-19 является исследование биологического материала из верхних и нижних дыхательных путей с помощью амплификации нуклеиновых кислот, наиболее распространенный из которых – метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР)¹.

Кроме того, лабораторная диагностика используется в целях организации противоэпидемиологических мер, в т.ч. тестирования людей, прибывших из мест с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой, контактных лиц, даже не имеющих симптомов заболевания².

У коронавируса есть механизмы редактирования ошибок РНК-зависимой РНК полимеразы (*RdRP*), поэтому скорость мутаций ниже, чем у других РНК-содержащих вирусов [5]. Однако это не исключает накопления замен в геноме вируса [6, 7]. Центр по контролю и профилактике болезней (Center for Disease Control and Prevention, CDC) Китая рекомендует использовать для тестирования два участка генома вируса – *ORF1ab* и ген *N* [8], CDC США – три участка гена *N* [9]. Также показали эффективность тест-системы, выявляющие коронавирус нового типа по другим генам – *ORF1a*, *ORF1ab*, *RdRP*, *E*, *N*, *S* [10, 11].

Цель – разработка и валидация набора реагентов для качественного определения рибонуклеиновых кислот (РНК) коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени, адаптированной для использования совместно с наборами для экстракции РНК в автоматическом режиме.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ / MATERIAL AND METHODS

Определение предела обнаружения / Determination of limit detection

Предел обнаружения определяли с использованием стандартного образца SARS-CoV-2 (EDX SARS-CoV-2 Standard, Bio-Rad, США). Стандарт представляет собой синтетические РНК-транскрипты, содержащие 5 генов коронавируса (*E*, *N*, *ORF1ab*, *RdRP* и *S*). Разведение стандарта до концентраций 1000, 500, 250 и 100 копий/мл осуществляли на образцах мазков со слизистой рото- и носоглотки, не содержащих РНК коронавируса нового типа.

Экстракцию РНК проводили с использованием набора реагентов «АмплиПрайм ФАСТ-Р» (ООО «НекстБио», Россия) по методике с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария, регистрационное удостоверение № РЗН 2018/6981 от 5 апреля 2018 г.).

Определение воспроизводимости и повторяемости / Determination of reproducibility and repeatability

Воспроизводимость и повторяемость определяли тестированием 60 повторов клинических образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2

в концентрации 10^4 копий/мл, полученных из Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского после проведения плановых исследований.

Концентрацию SARS-CoV-2 определяли относительно стандартных образцов предприятия (ООО «НекстБио», Россия). Экстракцию РНК проводили с использованием набора реагентов «АмплиПрайм ФАСТ-Р» по методике с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet.

Клинические испытания / Clinical tests

Клинические испытания были проведены с использованием биологического материала, полученного в ходе лечебно-диагностического процесса после проведения плановых лабораторных исследований. Исследованный материал включал:

- мазки со слизистой носо- и ротоглотки (132 образца);
- мокроту (112 образцов).

Биологический материал мазков со слизистой носо- и ротоглотки был забран в транспортную среду для хранения и транспортировки респираторных мазков (ООО «НекстБио», Россия, РУ № ФСР 2012/14200).

Экстракцию РНК из 100 мкл биоматериала проводили с помощью наборов реагентов «МагноПрайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) по методике с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet и «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Россия) в ручном режиме. Тесты ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ) выполняли на приборах планшетного типа (C1000 Touch в комплекте с модулем CFX96, Bio-Rad Laboratories, США) и роторного типа (Rotor-Gene Q, Qiagen, Германия).

Аналитическую специфичность набора оценивали тестированием нуклеиновых кислот микроорганизмов и вирусов и геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) человека. Нуклеиновые кислоты микроорганизмов и вирусов в концентрации не менее 10^6 копий/мл и геномную ДНК человека в концентрации 1 мкг/мл вносили в образцы биологического материала, не содержащие вирус SARS-CoV-2.

В исследование были включены следующие микроорганизмы: *B. paraptussis*, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, вирусы гриппа А H1N1, H3N2, H2N2, H7N9, H0N1, H5N1, вирус гриппа В линии Брисбен, вирус гриппа В линии Пхукет, коронавирусы человека 229E, NL63, OC43.

Для оценки влияния интерферирующих веществ в исследуемые образцы были внесены муцин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0,23 мг/100 мкл, гемоглобин (Sigma-Aldrich, США) – 0,20 ммоль/100 мкл, мирамистин (ООО «Инфамед К», Россия) – 0,001% действующего вещества в 100 мкл, хлоргексидин (ОАО НПЦ «Биоген», Россия) – 0,5% действующего вещества в 100 мкл.

В качестве набора сравнения был использован набор реагентов «РеалБест РНК SARS-CoV-2» (АО «Вектор-Бест», Россия). Экстракцию РНК из образцов биоматериала выполняли с помощью набора «РеалБест УниМаг» (АО «Вектор-Бест», Россия), тесты ОТ-ПЦР – на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Этические аспекты / Ethical aspects

Биологический материал, использованный для проведения работы, был получен после рутинных исследований. Дизайн исследования не был связан с риском для пациентов и не оказывал

¹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 15 (22.02.2022).

² Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» от 22.05.2020 № 15.

влияния на их права и благополучие. Способ получения материала не позволял провести идентификацию лица, от которого данный материал был получен. Исходя из этого одобрения этического комитета не требовалось.

Методы статистического анализа / Methods of statistical analysis

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета Excel MS Office (Microsoft, США).

Расчет клинической чувствительности (Ч) выполняли по формуле:

$$Ч = A / (A + B),$$

где А – количество истинно-положительных результатов; В – количество ложноотрицательных результатов.

Расчет клинической специфичности (Сп) проводили по формуле:

$$Сп = D / (D + C),$$

где D – количество истинно-отрицательных результатов; C – количество ложноположительных результатов.

Расчет нижней границы 95% доверительного интервала чувствительности ($Ч_n$) и специфичности ($Сп_n$) выполняли по формулам [12]:

$$Ч_n = \frac{2(A+B) \times Ч + Z_\gamma^2 - Z_\gamma \times \sqrt{Z_\gamma^2 + 4(A+B) \times Ч \times (1-Ч)}}{2(A+B + Z_\gamma^2)},$$

$$Сп_n = \frac{2(C+D) \times Сп + Z_\gamma^2 - Z_\gamma \times \sqrt{Z_\gamma^2 + 4(C+D) \times Сп \times (1-Сп)}}{2(C+D + Z_\gamma^2)},$$

где Z_γ – значение γ -квантиля нормального распределения ($\gamma = 1 - \alpha/2$, $\alpha = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Контроль качества / Quality control

Для контроля качества экстракции использовали внутренний контрольный образец, представляющий собой модифицированный фаг MS2. Отсутствие сигнала по внутреннему контролю говорит о неэффективной экстракции РНК из клинического материала, образец признается невалидным, требуется его повторный анализ начиная с этапа экстракции. Все результаты признаны валидными на основании амплификации внутреннего контрольного образца.

Контроль качества проведения анализа осуществляли с помощью положительного контрольного образца, представляющего собой модифицированный фаг MS2, несущий фрагмент РНК SARS-CoV2.

Автоматическая экстракция нуклеиновых кислот / Automatic extraction of nucleic acids

Для валидации автоматического метода экстракции РНК из клинического материала была проведена одновременная экстракция наборами реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (ручной метод) и «МагноПрайм ЮНИ» с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet. При использовании двух выделительных наборов, а также при проведении ОТ-ПЦР на двух приборах не было получено ни одного ложноположительного и ложноотрицательного результата. Все полученные результаты совпали.

Время, затрачиваемое на проведение экстракции РНК из 96 образцов с использованием станции Microlab STARlet, составило 1 ч 10 мин. Экстракция РНК набором реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» из 12–24 образцов занимает 45 мин. Длительность программы амплификации составляет 90 мин. Таким образом,

общее время, затрачиваемое на анализ при использовании автоматической станции, укладывается в 3 ч.

Аналитические характеристики / Analytical characteristics

Результаты определения предела обнаружения при тестировании разведения стандартного образца SARS-CoV-2 представлены в **таблице 1**, результаты исследования повторяемости и воспроизводимости – в **таблице 2**.

При исследовании аналитической специфичности перекрестных реакций с указанными возбудителями не выявлено.

Клинические характеристики / Clinical characteristics

Для исследования клинической специфичности и чувствительности нового набора были изучены 244 образца биологического материала одновременно с референсным набором «РеалБест РНК SARS-CoV-2». Все полученные результаты были признаны валидными на основании амплификации внутреннего контроля образца в исследуемом и референсном тестах.

При исследовании 132 образцов мазков со слизистой носоглотки обнаружено 66 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2, из 112 образцов мокроты – 56 положительных. Исследование с использованием референсного набора показало полное совпадение положительных и отрицательных результатов. На основании полученных данных была рассчитана диагностическая чувствительность и специфичность с учетом 95% доверительной вероятности. Результаты представлены в **таблице 3**.

Внесение в клинический материал интерферирующих веществ в указанных концентрациях не привело к получению ложноотрицательных результатов.

ОБСУЖДЕНИЕ / DISCUSSION

Молекулярно-биологические методы выявления РНК- и ДНК-возбудителей респираторных инфекций широко применяются в клинической практике и служат как для установления этиологической причины заболевания, так и для эпидемиологического надзора. Как показывают события 2020–2021 гг., это играет первостепенную роль в предотвращении распространения пандемии.

По данным коммуникационного штаба Правительства Российской Федерации [13], на начало ноября 2021 г. количество ПЦР-исследований составило более 500 тыс. в день, из них более 40 тыс. были положительными. Такое количество выполняемых анализов неизбежно означает огромную нагрузку на клиничко-диагностические лаборатории, поэтому необходимы решения, которые позволили бы проводить исследования в максимально автоматическом режиме и при этом оставались бы экономически оправданными.

Одной из основных задач нашей работы было определение аналитических и диагностических характеристик разработанного набора реагентов с использованием автоматических станций для экстракции нуклеиновых кислот.

Чувствительность набора реагентов при тестировании стандартного образца EDX SARS-CoV-2 составила 250 копии/мл, что равно 0,25 копии/мкл, или 2,5 копии на реакцию. Для сравнения, по имеющимся литературным данным, чувствительность анализа при использовании олигонуклеотидов, предложенных CDC для выявления SARS-CoV-2, составила от 0,3 до 2,1 копии/мкл [14]. Из отечественной практики опубликованы данные об аналитических характеристиках набора реагентов производства ООО «ДНК-Технология» с чуть более низкой чувствительностью: 10 копий на реакцию [15]. Основным различием проведенных исследований является использование нами внешнего количествен-

Таблица 1. Результаты определения предела обнаружения при тестировании разведения стандартного образца SARS-CoV-2**Table 1.** Results of limit detection evaluation during testing the standard SARS-CoV-2 sample

Концентрация РНК SARS-CoV-2, копий/мл // Concentration of SARS-CoV-2 RNA, copies/ml	Количество повторов (из них положительных), n / Number of repetitions, (of them positive), n	Среднее значение Ct (95% ДИ) / Mean Ct value (95% CI)
1000	5 (5)	35,9 (35,5–36,4)
500	20 (20)	37,4 (37,1–37,8)
250	20 (20)	38,5 (38,2–38,9)
100	20 (13)	39,4 (39,3–40,1)

Примечание. РНК – рибонуклеиновая кислота; Ct – количество циклов репликации, необходимое для формирования флуоресцентного сигнала; ДИ – доверительный интервал.

Note. RNA – ribonucleic acid; Ct – number of replication cycles required for fluorescent signal; CI – confidence interval.

Таблица 2. Повторяемость и воспроизводимость полученных результатов**Table 2.** Repeatability and reproducibility of the results

Концентрация РНК SARS-CoV-2, копий/мл // Concentration of SARS-CoV-2 RNA, copies/ml	Количество повторов, n / Number of repetitions, n	Среднее значение Ct (95% ДИ) / Mean Ct value (95% CI)	Значение CV, % / CV value, %
<i>Повторяемость / Repeatability</i>			
10 ⁴	60	34,3 (34,2–34,4)	1,1
<i>Воспроизводимость / Reproducibility</i>			
10 ⁴	120	32,8 (32,5–33,1)	4,7

Примечание. РНК – рибонуклеиновая кислота; Ct – количество циклов репликации, необходимое для формирования флуоресцентного сигнала; ДИ – доверительный интервал; CV – коэффициент вариации.

Note. RNA – ribonucleic acid; Ct – number of replication cycles required for fluorescent signal; CI – confidential interval; CV – variation coefficient.

Таблица 3. Диагностическая чувствительность и специфичность набора реагентов «АмплиПрим SARS-CoV-2 DUO» (ООО «НекстБио», Россия)**Table 3.** Diagnostic sensitivity and specificity of the AmpliPrime SARS-CoV-2 DUO reagent kit (NextBio LLC, Russia)

Клинический материал / Clinical specimens	Диагностическая чувствительность, % (95% ДИ) / Diagnostic sensitivity, % (95% CI)	Диагностическая специфичность, % (95% ДИ) / Diagnostic specificity, % (95%, CI)
Мазок со слизистой носо- и ротоглотки / Nasopharynx and oropharynx mucosa swabs	100 (95,6–100)	100 (95,6–100)
Мокрота / Sputum	100 (94,8–100)	100 (94,8–100)

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI – confidence interval.

но охарактеризованного стандартного образца, содержащего РНК SARS-CoV-2, что, возможно, позволило более точно определить чувствительность набора реагентов.

Коэффициент вариации при исследовании воспроизводимости результатов амплификации составил менее 5%. По литературным данным, при валидации наборов реагентов либо были получены схожие значения (не более 5%) [16], либо коэффициент вариации был выше (от 1,16% до 8,65%) [17].

Автоматические станции для выделения нуклеиновых кислот и приготовления ПЦР-смесей имеют ряд преимуществ перед ручными методами экстракции, в первую очередь за счет большей пропускной способности и стандартизованности процедуры экстракции. Длительность исследования с помощью станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet при анализе 96 образцов составила 1 ч 10 мин. Экстракция такого же количества образцов ручным методом занимает около 3 ч. При использовании автоматической станции весь анализ, включая этап экстракции и амплификации, длится на более 3 ч.

Важным этапом валидации набора реагентов является сравнение результатов с другим набором реагентов, зарегистрированным в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения

в установленном порядке. В качестве набора сравнения нами был использован набор реагентов «РеалБест РНК SARS-CoV-2». Различия в результатах могут быть связаны с разными областями генома, амплифицируемыми в ходе анализа, разной чувствительностью и методами экстракции нуклеиновых кислот. Несмотря на имеющиеся различия, сравниваемые наборы реагентов показали схожую чувствительность и специфичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ / CONCLUSION

В ходе исследования был разработан и апробирован набор реагентов «АмплиПрим SARS-CoV-2 DUO» (ООО «НекстБио», Россия) для выявления коронавируса нового типа. Набор определяет SARS-CoV-2 по двум фрагментам генома, что позволяет повысить надежность анализа. Предел обнаружения составил 250 копий/мл, что достаточно для надежного анализа. Коэффициент вариации при тестировании 120 образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2 в концентрации 10⁴ копий/мл, не превышает 5%.

Набор реагентов получил регистрационное удостоверение РЗН № 2020/10837 от 15 июня 2020 г. и может быть использован в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА:

- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., et al. The species *Severe acute respiratory syndrome related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med.* 2020; 173 (5): 362–7. <https://doi.org/10.7326/M20-3012>.
- Dos Santos W.G. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129: 110493. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110493>.
- Aguirre-Duarte N. Can people with asymptomatic or pre-symptomatic COVID-19 infect others: a systematic review of primary data. *medRxiv.* April 16, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.20054023>.
- Sevajol M., Subissi L., Decroly E., et al. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* 2014; 194: 90–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.008>.
- Hu B., Guo H., Zhou P., et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19: 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Tang X., Wu C., Li X., et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Nat Sci Rev.* 2020; 7 (6): 1012–23. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
- Niu P., Lu R., Zhao L., et al. Three novel real-time RT-PCR assays for detection of COVID-19 virus. *China CDC Wkly.* 2020; 2 (25): 453–7. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.116>.
- CDC's diagnostic test for COVID-19 only and supplies. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html> (дата обращения 20.11.2021).
- Corman V.M., Landt O., Kaiser M., et al. Detection of 2019 novel

- coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25 (3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Kubina R., Dziedzic A. Molecular and serological tests for COVID-19 a comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10 (6): 434. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060434>.
- Красько О.В. Статистический анализ данных в медицинских исследованиях. Часть I. Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова; 2014: 127 с.
- Отчет о текущей ситуации по борьбе с коронавирусом. 3 ноября 2021. URL: https://xn--80aesfpebagmflbc0a.xn--p1ai/ai/doc/1122/attach/2021-11-03_coronavirus_government_report.pdf (дата обращения 20.11.2021).
- Tastanova A., Stoffel C.I., Dzung A., et al. A comparative study of real-time RT-PCR-based SARS-CoV-2 detection methods and its application to human-derived and surface swabbed material. *J Mol Diagn.* 2021; 23 (7): 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.009>.
- Гончарова Е.В., Донников А.Е., Кадочникова В.В. и др. Диагностика вируса, вызывающего COVID-19, методом ПЦР в реальном времени. *ФАРМАКОЭКОНОМИКА. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.* 2020; 13 (1): 52–63. <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2020.13.1.52-63>.
- Watanabe R., Asai S., Kakizoe H., et al. Evaluation of the basic assay performance of the GeneSoc® rapid PCR testing system for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *PLoS One.* 2021; 16 (3): e0248397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248397>.
- Peng C.L., Jian M.J., Chang C.K., et al. Novel rapid identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by real-time RT-PCR using BD Max Open System in Taiwan. *Peer J.* 2020; 8: e9318. <https://doi.org/10.7717/peerj.9318>.

REFERENCES:

- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., et al. The species *Severe acute respiratory syndrome related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020; 5: 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Oran D.P., Topol E.J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med.* 2020; 173 (5): 362–7. <https://doi.org/10.7326/M20-3012>.
- Dos Santos W.G. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomed Pharmacother.* 2020; 129: 110493. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110493>.
- Aguirre-Duarte N. Can people with asymptomatic or pre-symptomatic COVID-19 infect others: a systematic review of primary data. *medRxiv.* April 16, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.04.08.20054023>.
- Sevajol M., Subissi L., Decroly E., et al. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* 2014; 194: 90–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.10.008>.
- Hu B., Guo H., Zhou P., et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19: 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Tang X., Wu C., Li X., et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Nat Sci Rev.* 2020; 7 (6): 1012–23. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>.
- Niu P., Lu R., Zhao L., et al. Three novel real-time RT-PCR assays for detection of COVID-19 virus. *China CDC Wkly.* 2020; 2 (25): 453–7. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.116>.
- CDC's diagnostic test for COVID-19 only and supplies. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html> (accessed 20.11.2021).
- Corman V.M., Landt O., Kaiser M., et al. Detection of 2019 novel

- coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25 (3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Kubina R., Dziedzic A. Molecular and serological tests for COVID-19 a comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics (Basel).* 2020; 10 (6): 434. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060434>.
- Krasko O.V. Statistical data analysis in medical research. Part I. Minsk: Sakharov International State Ecological Institute; 2014: 127 pp. (in Russ.).
- Report on the current situation in the fight against coronavirus. November 3, 2021. Available at: https://xn--80aesfpebagmflbc0a.xn--p1ai/ai/doc/1122/attach/2021-11-03_coronavirus_government_report.pdf (in Russ.) (accessed 20.11.2021).
- Tastanova A., Stoffel C.I., Dzung A., et al. A comparative study of real-time RT-PCR-based SARS-CoV-2 detection methods and its application to human-derived and surface swabbed material. *J Mol Diagn.* 2021; 23 (7): 796–804. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.04.009>.
- Goncharova E.V., Donnikov A.E., Kadochnikova V.V., et al. Real-time RT-PCR diagnostics of virus causing COVID-19. *FARMAKOEKONOMIKA. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya / FARMAKOEKONOMIKA. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology.* 2020; 13 (1): 52–63 (in Russ.). <https://doi.org/10.17749/2070-4909.2020.13.1.52-63>.
- Watanabe R., Asai S., Kakizoe H., et al. Evaluation of the basic assay performance of the GeneSoc® rapid PCR testing system for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *PLoS One.* 2021; 16 (3): e0248397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248397>.
- Peng C.L., Jian M.J., Chang C.K., et al. Novel rapid identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by real-time RT-PCR using BD Max Open System in Taiwan. *Peer J.* 2020; 8: e9318. <https://doi.org/10.7717/peerj.9318>.

Сведения об авторах

Дмитрюкова Марина Юрьевна – к.б.н., старший научный сотрудник ООО «НекстБио» (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6050-2393>; РИНЦ SPIN-код: 3021-2553. E-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru.

Голод Анастасия Алексеевна – младший специалист по разработке ООО «НекстБио» (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4058-2514>.

Сенина Мария Евгеньевна – директор научно-производственного комплекса ООО «НекстБио» (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8185-4459>; РИНЦ SPIN-код: 6122-0490.

Гущин Александр Евгеньевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» ДЗМ, учредитель ООО «ИнтерЛабСервис» (Москва, Россия). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0399-1167>; РИНЦ SPIN-код: 3496-6893.

About the authors

Marina Yu. Dmitryukova – PhD (Biol.), Senior Researcher, NextBio LLC (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6050-2393>; RSCI SPIN-code: 3021-2553. E-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru.

Anastasia A. Golod – Junior Development Specialist, NextBio LLC (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4058-2514>.

Maria E. Senina – Director, Research and Production Complex, NextBio LLC (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8185-4459>; RSCI SPIN-code: 6122-0490.

Aleksandr E. Gushchin – PhD (Biol.), Leading Researcher, Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology; Founder, InterLabService LLC (Moscow, Russia). ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0399-1167>; RSCI SPIN-code: 3496-6893.