

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Терновой В.А., Лутковский Р.Ю., Пономарева Е.П., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Тупота Н.Л., Смирнова А.М., Назаренко А.А., Локтев В.Б., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А.

ОБНАРУЖЕНИЕ РНК SARS-COV-2 В НОСОГЛОТОЧНЫХ МАЗКАХ БОЛЬНЫХ COVID-19 И БЕССИМПТОМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ МЕТОДАМИ ЦИФРОВОЙ ПЦР И ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, 630559, п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

В настоящей работе была проведена апробация двух разработанных нами наборов реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 по фрагменту гена ORF1ab в формате цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени. Были получены данные по выявлению РНК вируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей. Разработанные наборы реагентов обеспечивали 100% чувствительность и предел детекции в 10^3 ГЭ/мл для qPCR, и не менее 200 копий/мл вирусной РНК при проведении цифрового ПЦР. Выполнена апробация этих методов с помощью панели из 1328 образцов, собранных от пациентов с подозрением на COVID-19 в начале 2020 г. на территории РФ. Показано, что dPCR более чувствителен и может быть использован для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, в том числе от пациентов без клинических симптомов. dPCR значительно повышает точность лабораторного исследования и существенно снижает число ложноотрицательных результатов при диагностике SARS-CoV-2. Определение концентрации РНК SARS-CoV-2 у пациентов с различным клиническим течением заболевания показало, что концентрация вирусной РНК может резко снижаться в первые дни заболевания. Низкая концентрация вирусной РНК в пробах от пациентов также характерна при бессимптомном течении заболевания. Метод цифровой ПЦР обеспечивает более высокую выявляемость бессимптомных случаев заболевания, которая составляет приблизительно 75 % от числа инфицированных, в отличие от 45% выявляемости методом ПЦР в реальном времени. Полученные результаты по использованию метода цифровой ПЦР для детекции РНК SARS-CoV-2 показали, что этот метод особенно подходит для выявления РНК в случае ее низкой концентрации у контактных, а также для мониторинга изменения вирусной нагрузки у выздоравливающих пациентов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; ПЦР в реальном времени; цифровой ПЦР; COVID-19.

Для цитирования: Терновой В.А., Лутковский Р.Ю., Пономарева Е.П., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Тупота Н.Л., Смирнова А.М., Назаренко А.А., Локтев В.Б., Гаврилова Е.В., Агафонов А.П., Максюттов Р.А. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей методами цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (12): 785-792. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-785-792>
Ternovoi V.A., Lutkovsky R.Yu., Ponomareva E.P., Gladysheva A.V., Chub E.V., Tupota N.L., Smirnova A.M., Nazarenko A.A., Loktev V.B., Gavrilova E.V., Agafonov A.P., Maksyutov R.A.

DETECTION OF SARS-COV-2 RNA IN NASOPHARYNGEAL SWABS FROM COVID-19 PATIENTS AND ASYMPTOMATIC CASES OF INFECTION BY REAL-TIME AND DIGITAL PCR

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, World-class Genomic Research Center for Ensuring Biological Safety and Technological Independence within the framework of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

In this work we tested two reagent kits developed by us for detecting SARS-CoV-2 RNA using a fragment of the ORF1ab gene in digital PCR and real-time PCR formats. Data were obtained on the detection of SARS-CoV-2 virus RNA in nasopharyngeal swabs of patients with COVID-19 and asymptomatic carriers. The developed reagent kits provided 100% sensitivity and a detection limit of 10^3 GE / ml for qPCR, and at least 200 copies / ml of viral RNA when performing digital PCR. These methods were tested using a panel of 1,328 samples collected from patients with suspected COVID-19 at the beginning of 2020 in the Russian Federation. It has been shown that dPCR is more sensitive and can be used to analyze samples with low viral load, including those from patients without clinical symptoms. dPCR significantly improves the accuracy of laboratory research and significantly reduces the number of false negative results in the diagnosis of SARS-CoV-2.

Determination of the concentration of SARS-CoV-2 RNA in patients with different clinical course of the disease showed that the concentration of viral RNA can sharply decrease in the first days of the disease. A low concentration of viral RNA in samples from patients is also characteristic of asymptomatic disease. Digital PCR provides a higher detection rate for asymptomatic cases, which is approximately 75% of those infected, as opposed to 45% for real-time PCR. The results obtained on the use of the digital PCR method for detecting SARS-CoV-2 RNA showed that this method is especially suitable for detecting RNA in case of its low concentration in contacts, as well as for monitoring changes in viral load in convalescent patients.

Key words: SARS-CoV-2; real time PCR; digital PCR; COVID-19.

Для корреспонденции: Терновой Владимир Александрович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. мол. эпидемиологии особо опасных инфекций отд. мол. вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов; e-mail: tern@vector.nsc.ru

For citation: Ternovoi V.A., Lutkovsky R.Yu., Ponomareva E.P., Gladysheva A.V., Chub E.V., Tupota N.L., Smirnova A.M., Nazarenko A.A., Loktev V.B., Gavrilo E.V., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. Detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swabs from COVID-19 patients and asymptomatic cases of infection by real-time and digital PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(12): 785-792 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-12-785-792>

For correspondence: Ternovoi V.A., PhD., Head of Laboratory for Molecular Epidemiology of Particularly Dangerous Infections, Department for Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR; e-mail: tern@vector.nsc.ru

Information about authors:

Ternovoi V.A., <http://orcid.org/0000-0003-1275-171X>;
Lutkovsky R.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9497-8875>;
Ponomareva E.P., <http://orcid.org/0000-0002-5348-944X>;
Gladysheva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-7396-3954>;
Cub E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1521-897X>;
Tupota N.L., <http://orcid.org/0000-0001-6150-370X>;
Smirnova A.M., <https://orcid.org/0000-0002-3406>;
Nazarenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0812-0731>;
Loktev V.B., <http://orcid.org/0000-0002-0229-321X>;
Gavrilo E.V., <https://orcid.org/0000-0002-2014-3397>;
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>;
Maksyutov R.A., <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement # 075-15-2019-1665).

Acknowledgment. The authors express their sincere gratitude to the staff of the FBSI SSC VB "Vector" of Rospotrebnadzor for their assistance in the performance of this work: Sementsova A.O., Kartashov M.Yu., Eremeeva L.I., Bayandin RB, Bondarenko T.Yu., Bodnev S.A., Pyankov O.V., Pokhodnya S.A.

Received 07.08.2020
Accepted 31.08.2020

Введение. Пандемия коронавирусной болезни (COVID-19), вызванная в 2019 г. новым коронавирусом, началась в городе Ухань в Китае, широко распространилась по всему миру. Современные методы секвенирования позволили чрезвычайно быстро расшифровать геном вируса и провести его таксономическую идентификацию [1]. Вирус был классифицирован как новый коронавирус, названный SARS-CoV-2, принадлежащий к семейству *Coronaviridae*, отряду *Nidovirales*. Геном SARS-CoV-2 представлен несегментированной одноцепочечной РНК положительной полярности, размером около 29 890 нуклеотидов [2]. Это стало основой для создания методов генетической диагностики вируса SARS-CoV-2 и заболевания, вызываемого этим вирусом на основе ПЦР технологий [3]. Проведенный в дальнейшем анализ полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 показал, что природным резервуаром вируса SARS-CoV-2 и его предшественников могут быть летучие мыши и панголины [4]. Геном коронавируса панголина (pangolin-CoV) на 91% идентичен с геномом SARS-CoV-2 и филогенетически очень близко связан с RaTG13 коронавирусом летучих мышей. Ключевой белок S1 pangolin-CoV, участвующий во взаимодействии с клеточным рецептором ACE2 человека и предопределяющий развитие заболевания у человека, фактически схож с S1 белком SARS-CoV-2 человека. Пять ключевых аминокислот в рецептор-связывающем домене идентичны у pangolin-CoV и SARS-CoV-2. Кроме того, SARS-CoV-2 содержит потенциальный сайт расщепления фуриновой протеазы [5].

Для обнаружения РНК SARS-CoV-2 у пациентов с COVID-19 широко используются различные варианты ПЦР тест-систем в режиме реального времени (qPCR) [6]. Для оценки полученных результатов, как правило, применяются следующие критерии: значение $Ct \leq 40$ со-

ответствует положительному результату, значение $Ct > 40$ отрицательному [7]. Однако, ПЦР тест-системы в режиме реального времени, в диапазоне $35 < Ct < 40$ работают на пределе чувствительности и часто требуют перепроверки. Учитывая неопределенность в трактовке результатов при низкой вирусной нагрузке при диагностике SARS-CoV-2, чрезвычайно важным является разработка более чувствительных методов диагностики COVID-19.

Цифровая ПЦР (dPCR) - это ПЦР технология, которая разделяет реакционную смесь на большое количество меньших реакций, в каждой из которых присутствует только одна молекула нуклеиновой кислоты и, таким образом, можно получить данные по конечной точке, на основе интенсивности флуоресценции для каждой индивидуальной тестируемой молекулы [8-10]. Количественная оценка выполняется путем применения статистики Пуассона при расчете доли отрицательных микроячеек и положительных, которые изначально содержали более одной молекулы-мишени. dPCR обладает большей точностью чем qPCR, и его гораздо проще использовать для подсчета числа копий РНК и количественной оценки из-за бинарной природы, в которой реакционные микроячейки считаются либо положительными или отрицательными [11]. Кроме того, dPCR более устойчив к ингибированию в ПЦР по сравнению с qPCR [12-14].

Инкубационный период у коронавирусной инфекции обычно составляет 5,2 - 5,8 дней [15]. Инфицированные пациенты начинают быть заразными за два - три дня до возникновения первых симптомов заболевания. Примерно через 14-16 ч с момента первого проявления симптомов пациенты максимально опасны. Далее, в течение недели их способность к инфицированию окружающих падает вплоть до полного исчезновения. РНК коронавируса можно обнаружить в крови пациентов в

течение 20 дней и даже несколько дольше. Описаны случаи сохранения РНК в крови до 37 дней после начала заболевания [6-19]. Субклинические (пресимптоматические) и инapparантные формы COVID-19 имеют прогрессивное течение и обычно диагностируются только при обнаружении вирусных маркеров в респираторных мазках и бронхоальвеолярных смывах [20].

Целью данной работы была апробация двух разработанных наборов реагентов для обнаружения РНК SARS-CoV-2 по фрагменту ORF1ab гена в формате qPCR и dPCR в носоглоточных мазках больных COVID-19 и бессимптомных носителей, сравнение возможностей использования qPCR и dPCR технологий для анализа образцов на наличие генетических маркеров SARS-CoV-2 с целью улучшения чувствительности и точности диагностики COVID-19.

Материал и методы. Клинические образцы. Клинические образцы, в виде носоглоточных мазков, были получены из всех регионов Российской Федерации в течение января-апреля 2020 г. от пациентов, госпитализированных с подозрением на COVID-19 и лиц, контактировавших с ними. Всего за февраль-март 2020 г. поступило и было исследовано 1328 образцов носоглоточных смывов, собранных в соответствии с временными рекомендациями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека РФ от 21 января 2020 г. № 02/706-2020-27 по расследованию вспышек заболевания в период пандемии и освобождённых от институциональной проверки. Все исследования были выполнены, для клинических образцов в виде носоглоточных мазков, без дополнительного привлечения пациентов.

Выделение вирусной РНК. РНК была извлечена из клинических образцов с использованием набора РНК Рибо-ПРЕП (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Для оценки специфичности были использованы РНК вирусов птичьего гриппа А (H1N1, H3N2), вируса гриппа В/Victoria, коронавируса SARS и MERS, РНК сезонных коронавирусов человека (229E, HKU1, NL63 и OC43) и ДНК аденовируса 5 типа из коллекции ФБУН ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Проведение qPCR. Для выявления РНК COVID-19 были использованы разработанные нами и зарегистрированные Росздравнадзором РФ (регистрационное удостоверение № РЗН 2020/9677 от 11.02.2020) наборы реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG», ТУ 21.20.23-088-05664012-2020). ПЦР в режиме реального времени и регистрацию результатов проводили в приборе CFX 96 (Bio-Rad, США) по каналу FAM. Результаты qPCR интерпретировали на основании значения порогового цикла «Сt».

Проведение dPCR. Последовательности праймеров и зондов для детекции гена-мишени ORF1ab SARS-CoV-2, использованные для этого исследования, были ранее нами разработаны для набора реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG»). Реакционная смесь содержала ddPCR Supermix(x2) Bio-Rad, праймеры (900 nM), зонд (250 nM) и кДНК анализируемого образца. Каждая реакционная смесь была преобразована в водно-масляную эмульсию с использованием генератора капель (Bio-Rad, США) QX200. Полученную эмульсию перено-

сили на 96-луночный планшет и инкубировали при 95°C в течение 10 мин для формирования микрокапель, затем амплифицировали в термоциклере C1000 Touch (Bio-Rad, США) 40 циклов с параметрами: 94 °C в течение 10 с, 56 °C 15 с, 60 °C в течение 45 секунд и затем 96 °C в течение 10 минут. Планшет переносили в устройство для считывания капель QX200 (Bio-Rad, США) и анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft (V1.7.4, Bio-Rad, США).

Статистический анализ результатов. Коэффициент вариации для повторяемости результатов для qPCR рассчитывали по формуле: $Cv_p, \% = \frac{Ct(\text{станд. отклонение})}{Ct(\text{ср. значение})} \times 100 \%$ для 5 проб СОП ПКО 2019-nCoV. Коэффициент вариации воспроизводимости для qPCR рассчитывали по формуле: $Cv_p, \% = \frac{Ct(\text{станд. отклонение})}{Ct(\text{ср. значение})} \times 100\%$ для 10 проб. Линейный диапазон dPCR определялся путем оценки среднего числа копий кДНК в микрокапле [11]. Для оценки относительной ошибки использовали критерий Пуассона [12].

Результаты. Характеризация методов цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени для детекции генетического материала SARS-CoV-2. С целью обнаружения генетической информации коронавируса SARS-CoV-2 в экспериментальных и клинических образцах был разработан набор реагентов для выявления РНК (кДНК) коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Его конструирование было проведено с использованием последовательностей фрагмента гена ORF1ab SARS-CoV-2 и образцов кДНК вируса SARS-CoV-2 полученных из клинических образцов. Контроль специфичности теста проводили с использованием СОП ПКО 2019-nCoV серия № 02-03.20, представляющий собой раствор рекомбинантной плазмиды pCR 2.1, содержащей вирусоспецифическую вставку SARS-CoV-2 (длина 3,9 kb). Также были использованы экспериментальные пробы, содержащие генетический материал коронавируса SARS-CoV-2, РНК вирусов гриппа типа А (H1N1, H3N2), РНК коронавирусов видов 229E, NL63, OC43, HKU1 [21], коронавирусов SARS и MERS [22], аденовируса 5 типа, вируса денге и респираторно-синцитиального вируса [23]. Специфичность сконструированного теста была оценена на панели сформированной из 109 положительных клинических образцов от пациентов с COVID-19 и панели отрицательных проб из 44 образцов. Специфичность составила 100%.

Верхний предел обнаружения РНК SARS-CoV-2 (LoV) для разработанного метода qPCR, в соответствии с рекомендациями CLSI EP17-A [10], составил 2800 копий/мкл при Ct 14. Для определения нижнего предела аналитической чувствительности набора реагентов «Вектор-ПЦР_{РВ}-2019-nCoV-RG» делали последовательные десятикратные разведения СОП ПКО 2019-nCoV, серии № 02-03.20, от концентрации 10⁷ до 10² копий/мл (рис.1).

Коэффициент вариации повторяемости для qPCR не превышал 3 %, а коэффициент вариации не превышал 6 %. Серийные 10-кратные разведения СОП ПКО коронавируса SARS-CoV-2 использовали для построения графика линейной интерполяции между количеством копий генетического материала в миллилитре для dPCR и Ct в qPCR. Полученные результаты соответствовали ожидаемым значениям в каждом тестируемом интервале. Хорошую линейность ($R^2 \geq 0,9936$) наблюдали в диапазоне

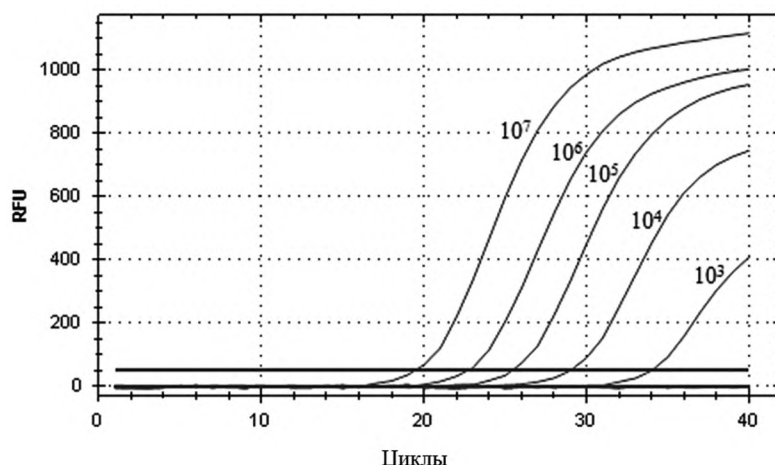


Рис. 1. Кривая интенсивности флуоресценции (RFU) для продуктов ПЦР в режиме реального времени по каналу FAM. Оценка аналитической чувствительности с 10-кратными разведениями СОП ПКО 2019-nCoV (10⁷ МЕ/мл) коронавируса SARS-CoV-2.

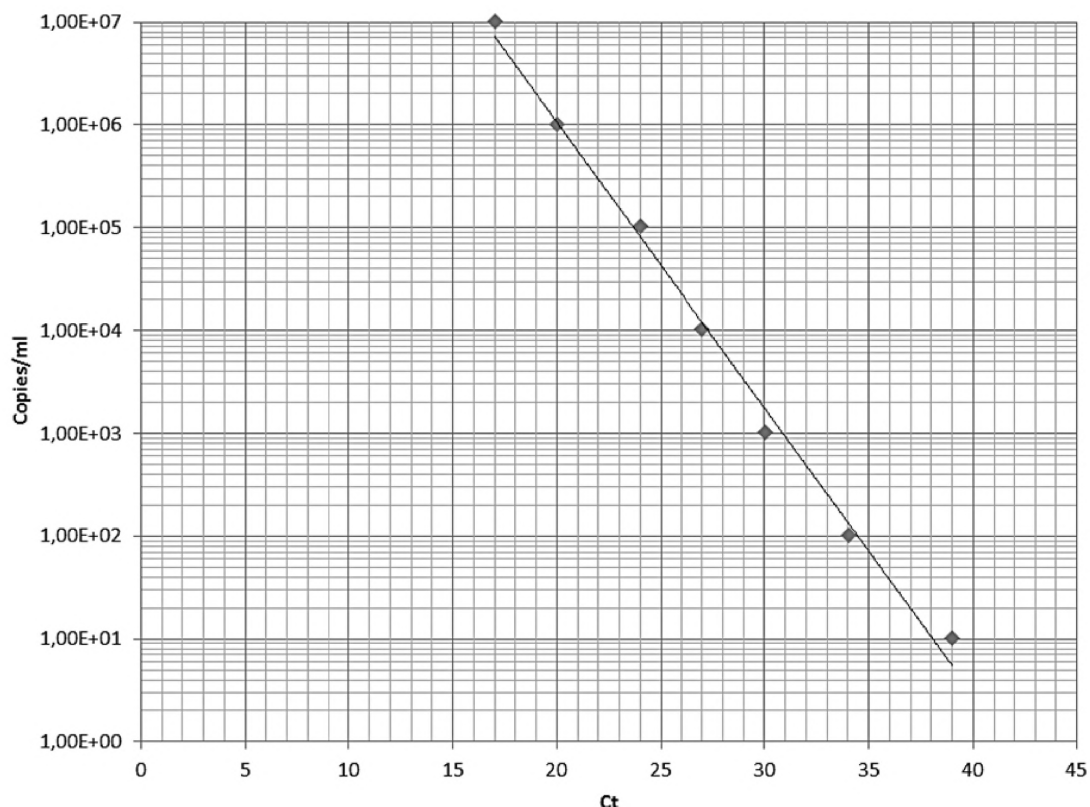


Рис. 2. График линейной интерполяции между параметрами «копий/мл» в dPCR и Ct в qPCR, для серийных 10-кратных разведений РНК SARS-CoV-2.

не от приблизительно 10⁷ до 10 копий/в реакции (рис. 2). LoB для данного метода, выраженное в геномных эквивалентах (ГЭ), составило 10³ ГЭ/мл (Ct 37).

Апробация методов ПЦР диагностики. За февраль-март 2020 г. при помощи ПЦР в реальном времени было исследовано 1328 образцов, поступивших из различных регионов Российской Федерации. Из них 32% образцов имели российское происхождение, 68% образцов были связаны с завозными на территорию РФ случаями COVID-19 (рис. 3). Завозные случаи были ассоциированы с более чем 20 странами мира. В начальный период

развития пандемии COVID-19 на территории РФ доминировали завозные случаи из Италии, Испании и Швейцарии, которые вместе составили 37% завозных случаев COVID-19 в РФ.

В 65% исследованных образцах была обнаружена РНК коронавируса SARS-CoV-2, из которых приблизительно 20% образцов были сомнительными и были отнесены к положительным образцам на основании проведения повторного qPCR анализа. По данным клинических наблюдений, у 40% пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 заболевание

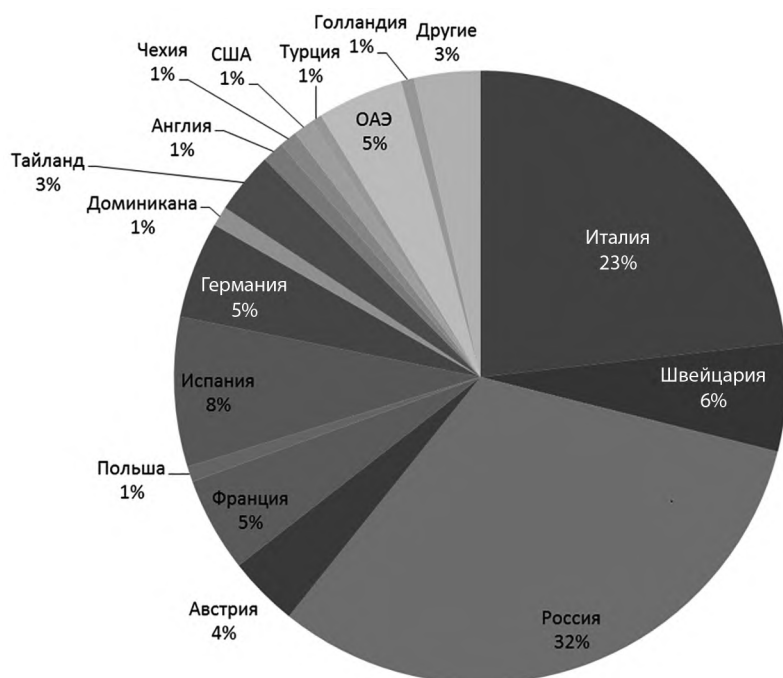


Рис. 3. Диаграмма процентного отношения количества образцов, поступивших в феврале-марте 2020 г. из различных регионов Российской Федерации, так и завозных случаев на территорию РФ, исследованные методом qPCR (всего 1328 образцов).

протекало без симптомов. У 22% болезнь протекала в форме внебольничных пневмоний, а у 25% — в форме ОРВИ.

Для сравнения эффективности диагностики коронавирусной инфекции методами qPCR и dPCR нами была сформирована панель из 171 образцов от пациентов с подозрением на COVID-19 и выполнены параллельные сравнительные исследования эффективности наборов «Вектор-ПЦРРВ-2019-nCoV-RG» и лабораторной системы для выявления вирусной РНК SARS-CoV-2 методом dPCR (см. таблицу).

При проведении qPCR было выявлено 109 положительных, 44 отрицательных и 18 сомнительных по наличию РНК SARS-CoV-2 образцов. Повторный анализ сомнительных образцов позволил отнести их к положительным. Таким образом, по данным qPCR было выявлено 127 положительных на SARS-CoV-2 образцов. Параллельно проводилась оценка образцов в dPCR. Результат считался положительным, если выявлялось $\geq 2,5$ копий/реакция. В 62 негативных и сомнительных образцах, по данным qPCR, с помощью dPCR были дополнительно выявлены 6 положительных образцов и 32 сомнительных. В 6 образцах не было обнаружено РНК копий SARS-CoV-2, либо из-за отсутствия вируса, либо из-за очень низкой вирусной нагрузки в этих образцах.

Таким образом, 44 отрицательных образца по данным qPCR 19 были протестированы с помощью dPCR, при этом, 6 были идентифицированы как положительные и 32 как сомнительные. Все сомнительные образцы были повторно анализированы на присутствие вирусной РНК в qPCR. Поскольку результаты были воспроизводимы, 32 образца были также отнесены к положительным образцам. Таким образом, из 171 у 165 пациентов, чьи образцы прошли положительный тест на SARS-CoV-2, был диагностирован COVID-19. Детекция РНК SARS-CoV-2 в образцах с применением dPCR была значительно более эффективной, и составила 96,5% против 74,3% для qPCR. При этом результаты, полученные методом qPCR, в целом, совпали с результатами dPCR (рис.4). Учитывая данные, полученные нами в сравнительном исследовании qPCR и dPCR, есть основание высказать предположение о том, что приблизительно 20% случаев qPCR не позволяет выявить положительные по SARS-CoV-2 образцы.

Оценка вирусной нагрузки проб от пациентов с COVID-19. Основные проблемы эффективного обнаружения маркеров коронавирусной инфекции связаны с наличием большого количества образцов с низкой вирусной нагрузкой, от 200 до 500 копий/мл. Как правило, это связано с наличием проб от пациентов в инкубаци-

Сравнительная оценка эффективности qPCR и dPCR при тестировании панели образцов (171 образец) от пациентов на наличие РНК SARS-CoV-2

Метод	Результат	Количество образцов	Критерии оценки образцов для qPCR и dPCR (Ct и копий РНК/мл, соответственно)
qPCR	отрицательные	44	$Ct \geq 41$
	сомнительные	18	$Ct 36-40$
	положительные	109	$Ct \leq 35$
dPCR	отрицательные	6	<200 копий/мл
	сомнительные	50	200-500 копий/мл
	положительные	115	>500 копий/мл

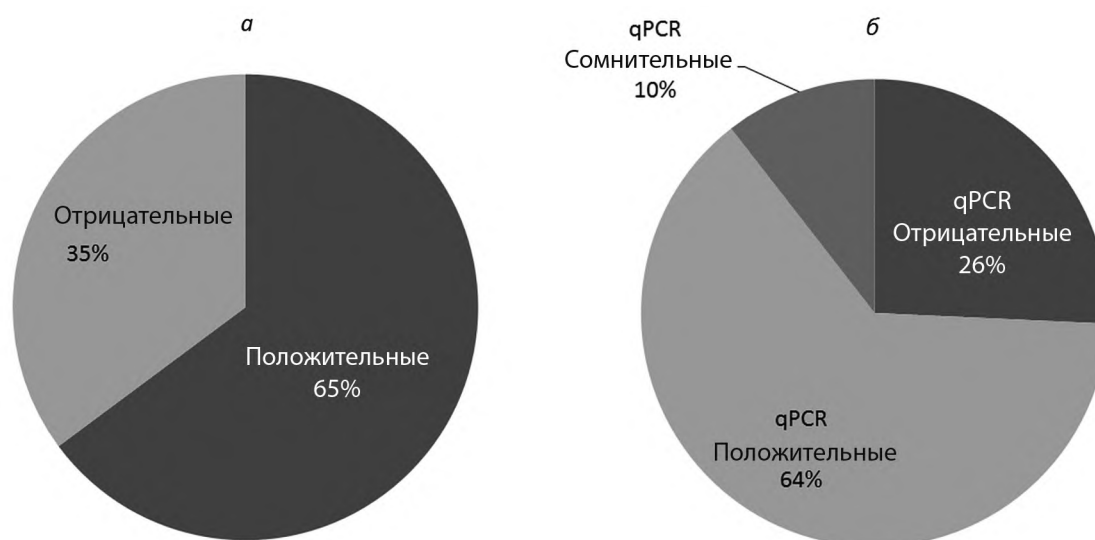


Рис. 4. Данные, полученные методом qPCR для 1328 образцов (за февраль-март 2020 г.) (а) и (б) для выборки образцов (171 образец), взятых параллельно для исследования методом dPCR.

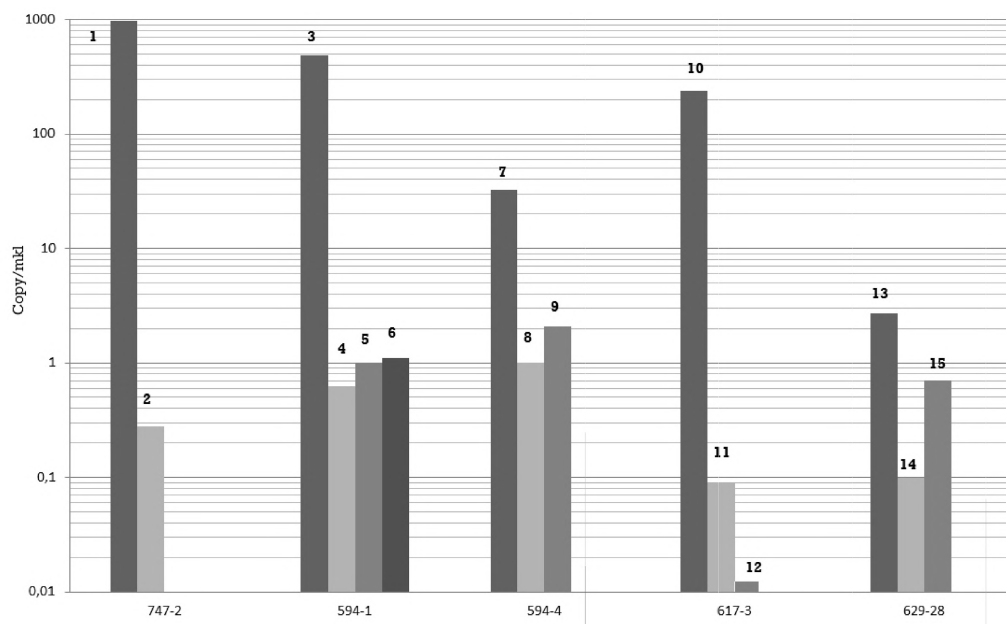


Рис. 5. Содержание РНК SARS-CoV-2 в образцах у больных COVID-19 (копий РНК/мкл.). Даты забора материала: пациент 747-2 (1) 20.03.2020 и (2) 01.04.2020; пациент 594-1 (3) 06.03.2020, (4) 08.03.2020, (5) 11.03.2020 и (6) 13.03.2020; пациент 594-4 (7) 06.03.2020, (8) 08.03.2020 и (9) 16.03.2020; пациент 617-3 (10) 09.03.2020, (11) 11.03.2020 и (12) 13.03.2020, пациент 629-28 (13) 11.03.2020, (14) 14.03.2020 и (15) 16.03.2020.

онном периоде и инapparантными формами COVID-19. Попытки оценить реальное количество таких людей ранее предпринимались в Сингапуре, Тяньцзине и Германии и оно примерно составляло от 44% до 62% исследованных проб [25]. Использование dPCR для тестирования пациентов с COVID-19 показало, что dPCR более чувствителен и может применяться для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, особенно для пациентов без клинических симптомов [24, 26].

Для определения вирусной нагрузки были использованы носоглоточные мазки от пациентов с COVID-19 на разных стадиях заболевания. Содержание РНК SARS-CoV-2 в образце оценивали по количеству копий РНК в одном микролитре образца (рис. 5). Так, у пациентов

594-1 и 617-3 количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках уменьшилось более чем в 1000 раз в первые двое суток после выявления COVID-19, и далее сохранялось на протяжении недели на уровне ≥ 1 копии/мкл. У пациентов 594-4 и 629-28, сразу после регистрации COVID-19, количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках определялось >30 копии / мкл, а затем, в течение двух суток снизилась в 10 раз. У пациента 747-2 через 10 сут после постановки диагноза COVID-19, количество РНК SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках определялось $>0,5$ копии/мкл.

Обсуждение. Полученные результаты показали, что в носоглоточных мазках у пациентов с COVID-19 в период проявления клинических симптомов заболевания

наблюдается высокая концентрация РНК SARS-CoV-2, которая составляет более 100 копий/мкл. По мере развития заболевания и в период реконвалесценции вирусная нагрузка резко уменьшалась до >1 копии/мкл. В пробах от пациентов с COVID-19 с бессимптомным течением заболевания также была обнаружена низкая концентрация РНК SARS-CoV-2, которая составляла около 1 копии/мкл.

Низкая вирусная нагрузка у этих групп пациентов может иметь большое значение для проведения лечения и карантинных мероприятий, хотя при этом вероятность инфицирования окружающих, по-видимому, сохраняется [29]. Принято считать, что qPCR, как стандартный метод обнаружения РНК SARS-CoV-2, играет важную роль в раннем выявлении COVID-19 у пациентов [24]. Обнаруженная недостаточная чувствительность метода может быть связана с рядом факторов: особенностями сбора образцов, их транспортировки и хранения, а также технические погрешности постановки ПЦР [27]. Это может быть причиной высокого уровня ложно-отрицательных результатов и для уточнения полученных результатов будет необходимо проведение повторных тестирований. Для его проведения требуется наличие высокочувствительных и точных подтверждающих тестов, что принципиально важно для своевременной и эффективной диагностики COVID-19.

В настоящее время, кроме qPCR, существуют и другие методы, такие как секвенирование следующего поколения (NGS) и обнаружение иммунологических маркеров. Выявление антивирусных IgM и IgG может также быть использовано в качестве подтверждающего метода диагностики COVID-19, вызванного SARS-CoV-2. Применение нескольких методов диагностики позволяет уменьшить количество ложноотрицательных результатов.

Однако диагностика, основанная на выявлении вирусных нуклеиновых кислот, до сих пор считается золотым стандартом. Метод цифровой ПЦР может быть важным подтверждающим тестом, который может значительно улучшить показатель выявляемости пациентов с COVID-19. Полученные результаты по использованию dPCR для детекции РНК SARS-CoV-2 показали, что этот метод особенно подходит для выявления РНК в случае ее низкой концентрации у контактных, а также для мониторинга изменения вирусной нагрузки у выздоравливающих пациентов [30]. Дополнительное преимущество количественного определения РНК SARS-CoV-2 заключается в том, что он позволяет количественно сравнивать результаты, полученные в разные сроки заболевания и в различных лабораториях. Количественная оценка мишеней с помощью dPCR обеспечивает высокое соответствие между различными постановками ПЦР различными операторами [28]. Таким образом, dPCR является методом выбора для оптимального определения вирусной нагрузки у бессимптомных и выздоравливающих пациентов.

Выводы

Разработаны наборы для проведения цифровой ПЦР и ПЦР в реальном времени для детекции генетического материала SARS-CoV-2 в пробах от пациентов, наборы обеспечивают 100% чувствительность и обеспечивают предел детекции в 10^3 ГЭ/мл для qPCR и не менее 200 копий вирусной РНК при проведении цифрового ПЦР.

Выполнена апробация этих методов с помощью панели из 1328 образцов, собранных от пациентов с подтверждением на COVID-19 в начале 2020 г. на территории

РФ. Показано, что dPCR более чувствителен и может быть использован для анализа образцов с низкой вирусной нагрузкой, в том числе от пациентов без клинических симптомов. dPCR значительно повышает точность лабораторного исследования и существенно снижает число ложноотрицательных результатов при диагностике SARS-CoV-2.

Определение концентрации РНК SARS-CoV-2 у пациентов с различным клиническим течением заболевания показало, что концентрация вирусной РНК может резко снижаться в первые дни заболевания. Низкая концентрация вирусной РНК в пробах от пациентов также характерна при бессимптомном течении заболевания. Метод цифровой ПЦР обеспечивает более высокую выявляемость бессимптомных случаев заболевания, которая составляет приблизительно 75% от числа инфицированных, в отличие от 45% выявляемости методом ПЦР в реальном времени.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за оказанную помощь при выполнении данной работы: Семенцову А.О., Карташову М.Ю., Еремееву Л.И., Баяндину Р.Б., Бондаренко Т.Ю., Бодневу С.А., Пьянкову О.В., Походня С.А.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 14-17, 20-30
см. REFERENCES)

13. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов для идентификации РНК коронавирусов видов 229E, NL63, OC43, HKU1 методом гибридной флуоресцентной обратной-транскрипционной полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2473702; 2011.
14. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации РНК коронавируса человека, ассоциированного с тяжелым острым респираторным синдромом. Патент РФ № 2504585; 2012.
15. Сергеева Е.И., Терновой В.А., Демина О.К., Демина А.В., Корнеев Д.В. и др. Разработка и испытание мультиплексной пцр в режиме реального времени для идентификации вирусов, вызывающих острые респираторные инфекции человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 4 : 32-7.

REFERENCES

1. Zhu N., Zhang D., Wang W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382:727-33.
2. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181(2):281-92.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9.
3. Qiu F., Wang H., Zhang Z., Cao L., Wang C., Wu J., Du Q. Laboratory testing techniques for SARS-CoV-2. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2020; 40(2):164-7. doi: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.02.04.
4. Tao Zhang, Qunfu Wu, Zhigang Zhang. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated With the COVID-19 Outbreak. *Curr. Biol*. 2020;30 (7): 1346-51.
5. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*. 2020; DOI: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

6. Zhai P., Ding Y., Wu X., Long J., Zhong Y., Li Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2020 May;55(5):105955. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105955. Epub 2020 Mar 28. PMID: 32234468.
7. https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765837?guestAccessKey=61b73a23-25e1-46bd-96c5-cf0ec847df25&utm_source=twitter&utm_medium=social_jama&utm_term=3324078795&utm_campaign=article_alert&linkId=88064719.
8. Quan P.-L., Sauzade M., Brouzes E. dPCR: A Technology Review Sensors (Basel). 2018 Apr; 18(4): 1271. Published online 2018 Apr 20. doi: 10.3390/s18041271.
9. Hindson B.J., Ness K.D., Masquelier D.A., Belgrader P., Heredia N.J., Makarewicz A.J. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem*. 2011;83: 8604-10.
10. Hindson C.M., Chevillet J.R., Briggs H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hindson B.J. et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*. 2013;10:1003-5.
11. Vogelstein B., Kinzler K.W. Digital pcr. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1999; 96:9236-41.
12. Dingle T.C., Sedlak R.H., Cook L., Jerome K.R. Tolerance of droplet-digital PCR VS real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clinical chemistry*. 2013;59:1668-70.
13. Sergeeva E.I., Ternovoi V.A., Agafonov A.P., Sergeev A.N. A set of oligodeoxyribonucleotide primers and fluorescently labeled probes for the identification of RNA of coronaviruses 229E, NL63, OC43, HKU1 by hybridization-fluorescent reverse transcriptase polymerase chain reaction. Patent RF № 2473702; 2011. (in Russian)
14. Li Y.C., Bai W.Z., Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. *J. Med. Virol*. 2020 Jun; 92(6):552-5. doi: 10.1002/jmv.25728. Epub 2020 Mar 11.
15. Madabhavi I., Sarkar M., Kadakol N. COVID-19: a review. *Monaldi Arch. Chest. Dis*. 2020 May 14; 90(2). doi: 10.4081/monaldi.2020.1298. PMID: 32498503.
16. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J. Pediatr*. 2020 Apr;87(4):281-6. doi: 10.1007/s12098-020-03263-6. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32166607.
17. Tian S., Hu W., Niu L., Liu H., Xu H., Xiao S.Y. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol*. 2020 May;15(5):700-4. doi: 10.1016/j.jtho.2020.02.010. Epub 2020 Feb 28. PMID: 32114094.
18. Sergeeva E.I., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Sergeev A.N. A set of oligodeoxyribonucleotide primers and a fluorescent-labeled probe for the identification of RNA of human coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. Patent RF № 2504585; 2012. (in Russian)
19. Sergeeva E.I., Ternovoy V.A., Demina O.K., Demina A.V., Korneev D.V. et al. Development and verification of real-time PCR assay for identification of viral agents causing acute respiratory infections in human beings. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013 October; 28(4): 32-7. DOI: 10.3103/S0891416813040083. (in Russian)
20. Wu Y., Strain M.C., Lada S.M., Luong T., Rought S.E., Gianella S., et al. Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS ONE*. 2013; 8:e55943.
21. Daniel W.T., Kristian L. M.D., Marina K., David A.A., Patricia E.G., Robert L.J. et al. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI EP17-A; 24(34).
22. Huggett J.F., Foy C.A., Benes V., Emslie K, Garson J.A., Haynes R. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. 2013;59:892-902.
23. Weaver S., Dube S., Mir A., Qin J., Sun G., Ramakrishnan R. Taking qPCR to a higher level: Analysis of CNV reveals the power of high throughput qPCR to enhance quantitative resolution. *Methods*. 2010;50:271-6.
24. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
25. Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J. et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. MedRxiv 2020.02.11.20021493. <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>.
26. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., et al. Transmission of 2019-nCoV Infection 245 from an Asymptomatic Contact in Germany. *N. Engl. J. Med*. 2020. DOI: 10.1056/NEJMc2001468.
27. Lianhua Dong, Junbo Zhou, Chunyan Niu, Quanyi Wang, Yang Pan, Xia Wang et al. Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. medRxiv 2020.03.14.20036129; DOI: 10.1101/2020.03.14.20036129.
28. Ai T., Yang Z., Hou H., Zhan C., Chen C., Lv W. et al. Correlation of chest Ct and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases. *Radiology*. 2020:200642.
29. Whale A.S., Jones G.M., Jernej P., Dreo T., Redshaw N., Akyürek S. et al. Assessment of digital PCR as a primary reference measurement procedure to support advances in precision medicine. *Clinical Chemistry*. 2018;64:1296-307.
30. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann. Intern. Med*. 2020 May 5;172(9): 577-82. doi: 10.7326/M20-0504. Epub 2020 Mar 10.

Поступила 07.08.20

Принята к печати 31.08.20