

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Жигалева О.Н.¹, Ермолаев И.И.^{1,2}, Марданлы С.Г.^{1,2}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}, Помазанов В.В.²

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА SARS-COV-2 В НАЗО- И ОРОФАРИНГЕАЛЬНЫХ МАЗКАХ МЕТОДОМ ПРЯМОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Вспышка COVID-19 оказала серьезное влияние на клинические диагностические лаборатории. В связи с быстрым распространением и увеличением числа случаев заболевания, вызванным вирусом SARS-CoV-2, точные подходы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот, стали быстрой и надежной технологией обнаружения инфекционных агентов. Среди тестов на нуклеиновые кислоты метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) считается «золотым стандартом», а ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) сегодня представляет большой интерес для обнаружения вируса SARS-CoV-2 из-за ее преимуществ в качестве специфического и простого качественного анализа. Актуальность данного исследования очевидна, так как ПЦР обладает целым рядом преимуществ перед другими методами диагностики. Это специфичность, чувствительность, быстрота, прямое определение возбудителя в любом материале.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; биологический материал; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Помазанов В.В. Разработка набора реагентов для обнаружения РНК вируса SARS-CoV-2 в назо- и орофарингеальных мазках методом прямой полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (12): 739-743. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743>

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: jigon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.11.2022

Принята к печати 10.11.2022

Опубликовано 00.12.2022

Zhigaleva O.N.¹, Ermolaev I.I.^{1,2}, Mardanly S.G.^{1,2}, Gashenko T.Yu.^{1,2}, Pomazanov V.V.²

DEVELOPMENT OF A REAGENT KIT FOR THE REAL-TIME DETECTION OF SARS-COV-2 RNA IN NASO- AND OROPHARYNGEAL SMEARS BY DIRECT POLYMERASE CHAIN REACTION

¹CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

The COVID-19 outbreak has had a serious impact on clinical diagnostic laboratories. Due to the rapid spread and increase in the number of cases caused by the SARS-CoV-2 virus, precise approaches based on the detection of nucleic acids have become a fast and reliable technology for detecting infectious agents. Among nucleic acid tests, the polymerase chain reaction (PCR) method is considered the “gold standard”, and real-time reverse transcription PCR (RT-PCR-RV) is of great interest today for the detection of the SARS-CoV-2 virus because of its advantages as a specific and simple qualitative analysis.

The relevance of this study is obvious, because PCR has a number of advantages over other diagnostic methods. This is specificity, sensitivity, speed, direct determination of the pathogen in any material.

Key words: COVID-19 (SARS-CoV-2); real-time reverse transcription – polymerase chain reaction; biological material; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Pomazanov V.V. Development of a reagent kit for the real-time detection of SARS-CoV-2 RNA in naso- and oropharyngeal smears by direct polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (12): 739-743 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-739-743>

For correspondence: Zhigaleva Olga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOLab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;

Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>;

Pomazanov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>.

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

Acknowledgment. The study was funded by CJSC «EKOLab».

Received 02.11.2022

Accepted 10.11.2022

Published 00.12.2022

Введение. Коронавирусная инфекция SARS-CoV-2 – заболевание, возбудителем которого является коронавирус 2 типа, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС). Вспышка возникла и вызвала пандемию в конце 2019 года. ВОЗ присвоила официальное название инфекции COVID-19 («Coronavirus disease 2019»), до этого использовался термин 2019-nCoV.

Международный комитет по таксономии вирусов присвоил возбудителю название SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2).

Эпидемия, вызванная коронавирусом 2019-nCoV, была объявлена ВОЗ «чрезвычайной ситуацией в здравоохранении, имеющей международное значение 10».

Доступ к экономически эффективному, высокочувствительному и высокоспецифичному методу диагностики COVID-19 будет способствовать лучшему контролю за пандемией. Увеличение выявляемости носителей SARS-CoV-2 может оказать помощь в принятии управленческих решений и планировании мероприятий организаторами здравоохранения. В условиях пандемии COVID-19 особенно важно, чтобы количество инфицированных пациентов и тяжелых случаев заболевания не превысило возможности системы здравоохранения. Для этого необходимо создать хорошую диагностическую систему тест-препаратов, позволяющих оценивать вирусный статус людей на ранних стадиях вирусносительства.

Выделение РНК является ключевым преаналитическим этапом в ПЦР исследовании. Однако, масштабы пандемии COVID-19 вызывает сбой в глобальных цепочках поставок коммерческих наборов, необходимых для выделения РНК. Также экстракция РНК является трудоемким процессом и занимает много времени. В связи с этим была разработана система диагностики коронавирусной инфекции из мазков носоглотки/ротоглотки на основе набора реагентов для метода прямой ПЦР в режиме реального времени, не требующего предварительного этапа экстракции РНК и клетки.

Цель исследования – разработать набор реагентов для качественного выявления РНК вируса SARS-CoV-2 методом прямой ОТ-ПЦР в реальном времени «КовидЭК Директ».

Материал и методы. Биологический материал получен из 7 регионов России: Белгородской, Ростовской, Томской, Московской, Курской, Владимирской, Ульяновкой областей с 2020 по 2021 год. У людей были клинические признаки ОРВИ.

229 образцов биологического материала (мазки со слизистой оболочки носо- и ротоглотки) получены от пациентов с подтвержденным клиническим диагнозом COVID-19.

В качестве отрицательных образцов использовали штаммы из коллекции ATCC (American Type Culture Collection, США).

Экстракцию нуклеиновых кислот для сравнительных наборов проводили методом осаждения изопропанолом («Рибо-преп», Амплисенс, Россия) [1, 2].

Наборы для сравнения: набор реагентов «SARS-CoV-2 Лайт» компании ООО «ДНК-Технология

ТС», набор реагентов «CITO-COV-2-TEST» компании ООО «ТестГен», набор реагентов «МБСТест FAST SARS-CoV-2 PHK» компании ООО «Медико-биологический Союз», РеалБест PHK SARS-CoV-2», АО «Вектор-Бест» [3].

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank проводили с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Специфичность выбранных олигонуклеотидов изучали с помощью компьютерной программы BLAST online [4].

Результаты и обсуждение. На основе литературных данных и анализа нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank в этом исследовании было использовано 870 полно-размерных геномов SARS-CoV-2, представляющих вирусные изоляты от пациентов, живущих в разных географических регионах. Для создания праймеров были выбраны две геномные области коронавируса SARS-2 – нуклеокапсид (N), открытая рамка считывания (ORF1ab) [5].

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных нуклеотидов в последовательностях SARS-2 с использованием биотехнологических программ. Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких как GC%, температура плавления (Tm), длина праймера и их взаимосвязи между собой.

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению коронавируса методом ПЦР стало использование гена самого человека. В качестве гена-мишени был выбран ген эндорибонуклеаза (РНКаза Р). Человеческая рРНК проходит в методе ПЦР те же этапы, что и вирусная РНК, а именно: лизис клетки, обратную транскрипцию, амплификацию [5,6].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена Рибонуклеазы Р, взятых в базе данных GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [7].

Подбор реакционной смеси проводили на основе нескольких энхансеров, таких как бетаин, диметилсульфоксид (ДМСО), формамид и некоторых детергентов IGEPAL и додецилсульфат натрия (SDS) в разных концентрациях [8-11].

В итоге, для создания реакционной смеси применяли следующие компоненты: 2х ПЦР буфер (0,5 М Tris Cl, pH 8,6, 0,05 М KCl, 15 мМ MgCl₂, 1% Tween 20), рабочая концентрация Taq-полимеразы – 5 ед/мкл, рабочая концентрация каждого праймера и зондов составляет 1 рМ/мкл, 5 % ДМСО, 0,5 % IGEPAL CA-630, 40 единиц ревертазы и 40 единиц ингибитора рибонуклеаз. Объем реакции 25 мкл. Объем пробы 5 мкл нативных носоглоточных мазков.

Оценка работоспособности набора реагентов проведена на биологических пробах, полученных из 7 регионов России. Образцы мазков отобраны сухими стерильными ватными тампонами на пластиковой основе. Тампон вводили легким движением по наружной стенке носа на глубину 2–3 см до нижней

раковины. Затем тампон вводили в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину, делали вращательное движение вдоль наружной стенки носа. После взятия материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещали в стерильную одноразовую пробирку с защелкивающейся крышкой, содержащей физиологический раствор. Пробирку плотно закрывали крышкой.

Подготовленные для проведения ПЦР пробирки помещали в амплификатор, который программировали по следующей схеме: обратная транскрипция – 55 °С, 10 мин, начальная денатурация – 95 °С 2 мин, основное циклирование – 40 шагов при денатурации 95 °С 5 секунд. Отжиг 60 °С 15 с, элонгация 67 °С 15 секунд.

Амплификацию и детекцию проводили как отдельно для выявления SARS-CoV-2 по одному каналу (моноплексное выявление), так и одновременно выявляли SARS-CoV-2 и ген человека (ВКО) по двум каналам (мультиплексное выявление) для оценки возможности конкуренции между каналами для ВКО и спецификации.

Включенный в тест ген РНКазы Р человека в качестве внутреннего контроля помогал оценивать качество проведенных исследований и достоверность результатов.

Было проанализировано 229 образцов биологического материала пациентов с положительным результатом на SARS-CoV-2 (набор «РеалБест РНК SARS-CoV-2», АО «Вектор-Бест») и 100 мазков, отрицательных по клиническим проявлениям и по ПЦР тесту (набор «РеалБест РНК SARS-CoV-2», АО «Вектор-Бест»). Результаты сравнительной детекции SARS-CoV-2 и SARS-CoV-2 + ген человека представлены на рис 1, а, б, где по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс количество циклов (Cycles).

Конкуренции между каналами не выявлено. Все результаты по выявлению положительных и отри-

цательных проб совпали с набором РеалБест РНК SARS-CoV-2» (АО «Вектор-Бест»), предусматривающих экстракцию РНК.

Данные проведенных исследований показали, что подобранная программа анализа (амплификации) и реакционная смесь позволяют проводить исследования методом прямой ПЦР, исключая этап экстракции РНК при выявлении коронавируса SARS-CoV-2 по двум каналам детекции без конкуренции между ними и позволяет детектировать РНК коронавируса SARS-CoV-2 за 60 минут.

Для определения чувствительности набора были созданы искусственные положительные образцы на основе плазмид для двух SARS-CoV-2-специфичных фрагментов генов N и ORF, а также синтетическая ДНК – плазида со встройкой фрагмента гена РНКазы Р человека. На основе полученных плазмид при проведении испытаний для оценки аналитической чувствительности (предела обнаружения) готовили стандартный образец предприятия, концентрация 10⁶ копий/мл, который последовательно разводили с шагом 10 от 10⁶ ГЭ копий/мл до 10² ГЭ копий/мл. Подтверждение правильности синтеза нуклеотидной последовательности проводили методом циклического секвенирования по Сэнгеру.

Спектрофотометрически определяли концентрацию приготовленного раствора искусственного защищенного специфического фрагмента гена и методом построения калибровочной кривой в амплификации.

Искусственные положительные образцы были созданы путем добавления в отрицательные образцы рото/носоглоточных мазков, полученных от пациентов, в разных количествах охарактеризованного обезвреженного образца РНК вируса SARS-CoV-2, т.е. плазмидная конструкция со встроенными генами с концентрациями 10 от 10⁶ ГЭ копий/мл до 10² ГЭ копий/мл. С такими образцами была проведена прямая ПЦР-РВ.

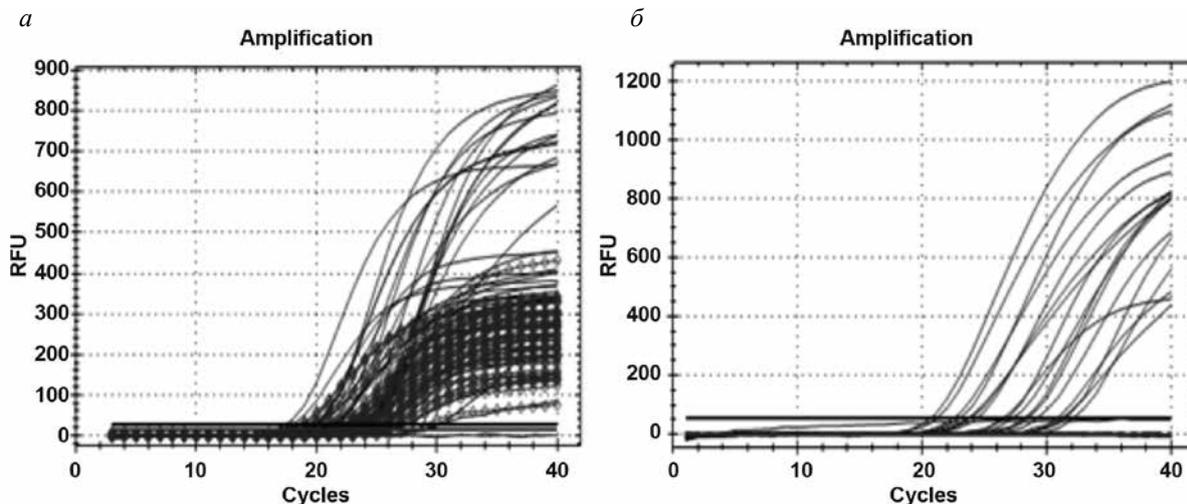


Рис. 1. Результаты сравнительной детекции SARS-COV-2 и SARS-COV-2+ген человека.

а – результаты детекции по двум каналам в прямой ПЦР в одной пробирке (SARS-CoV-2 + ВКО); б – результаты детекции по одному каналу в прямой ПЦР в одной пробирке SARS-CoV-2). Ровные кривые – это выявление РНК коронавируса (специфика), ромбообразные кривые – это выявление РНК гена человека (ВКО).

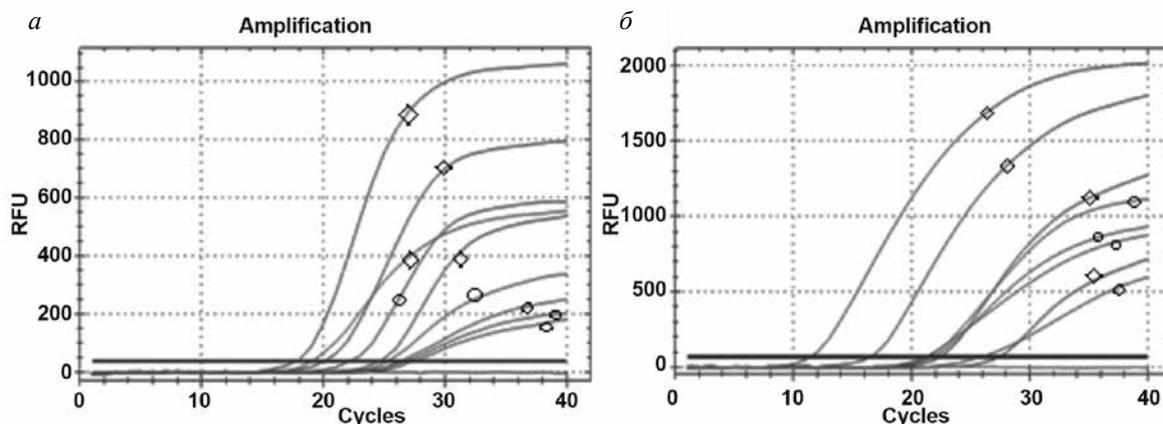


Рис. 2. Результаты аналитической чувствительности набора реагентов «КовидЭк Директ» ЗАО «ЭКОлаб». *a* – данные титрования плазмидной конструкции гена ORF в носоглоточных мазках; *b* – данные титрования плазмидной конструкции гена N в носоглоточных мазках. Кривые, помеченные ромбом – это плазмидные конструкции, кривые, помеченные кружком – это выявление РНК гена человека (ВКО).

Сравнение наборов для прямой ОТ-ПЦР-РВ

№ п/п	Характеристики наборов	Производители / название набора			
		ЗАО «ЭКОлаб» КовидЭк Директ РЗН 2021/14914 от 28.07.2021	ООО «ДНК-Технология ТС» SARS-CoV-2 Лайт РЗН 2021/15854 от 25.11.2021	ООО «ТестГен» Cito-CoV-2-Test РЗН 2021/16181 от 27.12.2021	ООО «Медико-биологический Союз» «МБС-Тест FAST SARS-CoV-2 РНК» РЗН 2022/16768 от 29.03.2022
1	Аналитическая чувствительность	1 000 ГЭ/мл	1 000 ГЭ/мл	500 ГЭ/мл	1 000 ГЭ/мл
2	Диагностическая специфичность	100%	100%	94,5%	100%
3	Диагностическая чувствительность	100%	100%	96,9%	100%
4	ВКО	Эндогенный, не требует ручного внесения	Экзогенный, требует ручного внесения	Экзогенный, требует ручного внесения	Эндогенный, не требует ручного внесения
5	Генетические мишени	Гены ORF1ab и N	Гены E и RdRP	Ген N	Гены RdRp и N
6	Время амплификации	От 60 мин	От 90 мин	От 90 мин	От 70 мин
7	Разморозка/заморозка	до 10 раз	Нет данных	Нет данных	До 10 раз

Результаты по определению аналитической чувствительности набора реагентов «КовидЭк Директ» ЗАО «ЭКОлаб» приведены на рис 2, *a*, *b*, где по оси ординат обозначен уровень флуоресценции (RFU), по оси абсцисс количество циклов (Cycles).

Чувствительность набора определена как 1×10^3 ГЭ/мл. Повторяемость и воспроизводимость определения РНК SARS-CoV-2 были установлены путем тестирования положительных и отрицательных носоглоточных мазков.

Условия повторяемости включали в себя: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации для повторяемости рассчитывался по формуле:

$$CV_p, \% = \frac{Ct(\text{станд.отклон})}{Ct(\text{ср.знач.})} \times 100\%,$$

и не превышал 3 %.

Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные

дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни. Коэффициент вариации для воспроизводимости рассчитывался по формуле:

$$CV_p, \% = \frac{Ct(\text{станд.отклон})}{Ct(\text{ср.знач.})} \times 100\%,$$

и не превышал 6 %.

Таким образом, воспроизводимость и повторяемость работоспособности набора реагентов составляет 100%.

Разработанный набор реагентов сравнивали с другими наборами для прямой ПЦР по следующим характеристикам:

- сравнение основных показателей, связанных со специфичностью и чувствительностью наборов;
- вариант контроля проведения реакции с использованием ВКО;
- сравнение генетической мишени для проведения реакции прямой ОТ-ПЦР-РВ;
- скорость постановки и получение результата.

Характеристики наборов представлены в таблице.

По данным, представленным в таблице, аналитическая чувствительность наборов «КовидЭк Директ», «SARS-CoV-2 Лайт» и «МБС-Тест FAST SARS-CoV-2 РНК» составляет 1000 ГЭ/мл, в то время как набор «СИТО-COV-2-TEST», обладает большей чувствительностью и составляет 500 ГЭ/мл. Диагностическая чувствительность и специфичность по имеющимся данным трех наборов составляют 100%. У набора «СИТО-COV-2-TEST» диагностическая специфичность составила 94,5%, а диагностическая чувствительность 96,9% и оказалась меньше по сравнению с другими производителями [12].

Во всех рассматриваемых наборах присутствует ВКО, однако, несмотря на его присутствие, имеются некоторые различия в его природе. На данный момент в практике существуют два разных подхода к дизайну для внутреннего контроля: эндогенный и экзогенный. Эндогенный внутренний контроль – это тип внутреннего контроля, использующий гены человека, позволяющий судить о наличии генетического материала в образце. Это защищает от ложноотрицательных результатов, показывая, что образец РНК действительно присутствует, и что все этапы сбора, выделения и амплификации были успешными. Экзогенные системы внутреннего контроля немного сложнее. Они включают добавление ВКО к каждому образцу. Добавление экзогенного контроля зачастую не позволяет в полной мере оценить ход проведения реакции, поскольку не дает определить, прошел ли лизис вирусных частиц в образце или нет.

В качестве генетической мишени в наборах «КовидЭк Директ» и «SARS-CoV-2 Лайт», «МБС-Тест FAST SARS-CoV-2 РНК» используются несколько генов ORF1ab и N и E, RdRP. Использование нескольких генов в наборах является более целесообразным с точки зрения проведения анализа, т.к. постоянное циркулирование вируса в популяции приводит к его изменению и появлению новых штаммов, что может отразиться и на работе ПЦР набора и появлению ложноотрицательных результатов. При появлении нового штамма возникает возможность изменения одного или пары генов, в связи с этим в наборы компаний ООО «ДНК-Технология ТС», ООО «Медико-биологический Союз» и ЗАО «ЭКОлаб» имеют явное преимущество по сравнению с набором «СИТО-COV-2-TEST», в котором в качестве мишени используется только один ген N.

Самое короткое время амплификации у набора «КовидЭк Директ» – от 60 минут.

Заключение. Разработанный набор реагентов и методика для диагностики новой коронавирусной инфекции на основе прямой ОТ-ПЦР в реальном времени позволит значительно сократить время, затрачиваемое на проведение выявления РНК SARS-CoV-2 в клиническом материале, обладая хорошей чувствительностью и специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-11 см. REFERENCES)

1. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний; 2015.
2. Методическое пособие Основы Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР) / ООО «ДНК-Технология ТС». Систем. требования: Adobe Acrobat Reader. URL: https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf (дата обращения: 11.07.2022).
3. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения: государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (дата обращения 05.07.2022).
12. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Анализ отечественного рынка наборов для диагностики COVID-19 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (11):672-7. DOI:10.51620/0869-2084-2022-67-11-672-677.

REFERENCES

1. Rebrikov D.V. Real-time PCR. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2015. (in Russian)
2. Manual on Polymerase Chain Reaction (PCR) Basics / LLC «DNA-Technology TS». System requirements: Adobe Acrobat Reader. URL: https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf (accessed 11 July 2022). (in Russian)
3. Federal Service for Surveillance in Healthcare (Roszdravnadzor): state register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices. URL: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (accessed 05 July 2022). (in Russian)
4. Basic Local Alignment Search Tool. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
5. Park M., Won J., Choi B. Y., Lee C. J. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Experimental. molecular. medicine*. 2020; 52(6): 963–77. DOI: 10.1038/s12276-020-0452-7.
6. Bruce E. A., Huang M. L., Perchetti G. A., Tighe S. Direct RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA from patient nasopharyngeal swabs without an RNA extraction step. *PLoS biology*. 2020; 18(10): 1-14. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000896.
7. International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
8. Craig N., Fletcher S. L., Daniels A., Newman C. Direct Lysis RT-qPCR of SARS-CoV-2 in Cell Culture Supernatant Allows for Fast and Accurate Quantification. *Viruses*. 2022; 14(3): 508. DOI: 10.3390/v14030508.
9. Bruno A., de Mora D., Freire-Paspuel B., Rodriguez A.S., Paredes-Espinosa M.B. et al. Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 109: 315–20. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.06.038.
10. Merindol N., Pepin G., Marchand C., Rheault M. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2020; 128:1-4. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104423.
11. Yang B. H., Chung H. Y., Kao L. T., Jian M. J. Emergency SARS-CoV-2 variants of concern: rapidly direct RT-qPCR detection without RNA extraction, clinical comparison, cost-effective, and high-throughput. *Aging*. 2022; 14(11): 4624–33. DOI: 10.18632/aging.204095.
12. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardany S.G., Gashenko T.Yu. Analysis of the domestic market for COVID-19 diagnostic kits by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(11): 672-7. DOI:10.51620/0869-2084-2022-67-11- 672-677. (in Russian)