

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ «КОНЕЧНАЯ ТОЧКА» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА SARS-CoV-2 В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ: ПРОСПЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

¹Д. Ю. Пищугин[✉], ²Р. А. Тарумов[✉], ¹С. Г. Шубенкин[✉], ¹А. Н. Шеменева[✉], ¹О. Г. Цинцадзе[✉],
¹Л. Л. Охотская[✉]

¹637 центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора, г. Севастополь, Россия

²Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины,
Санкт-Петербург, Россия

ЦЕЛЬ: Оценка возможности использования аппаратных технологий, имеющихся на снабжении Вооруженных сил России, для проведения массового оперативного скрининга военнослужащих на наличие РНК вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР по «конечной точке» в полевых условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ: Была использована ПЦР по «конечной точке» по протоколу выявления РНК вируса комплектом тест-системы ПЦР-РВ «Поливив SARS-CoV-2» с реагентом выделения «РНК-экспресс» совместного производства ООО НПФ «Литех» и Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА. Биоматериалом для исследования явились 157 образцов назофарингеальных мазков, отобранных у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания и контактных по COVID-19.

Статистика. Полученные в ходе экспериментальных исследований данные подвергали стандартной статистической обработке в программе «Statistica 6,0». Для оценки значимости различия частот наблюдения изучаемого признака в независимых группах использовали непараметрический критерий Пирсона хи-квадрат (χ^2). Вероятность $p \leq 0,05$ и выше считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Установлено, что из 157 проб биоматериала, оцененных на содержание генетических маркеров вируса SARS-CoV-2 методом ПЦР по «конечной точке» и методом ПЦР «Real time», 141 и 146 проб, соответственно, оказались положительными. При этом статистически значимых отличий между полученными данными в указанных методах обнаружено не было ($\chi^2=1,013$, $p=0,31$).

ОБСУЖДЕНИЕ: Показано, что сравнительная характеристика изученных методов лабораторной диагностики вируса SARS-CoV-2 предположила возможность детекции специфического участка генома вируса по технологии ПЦР «конечная точка» с использованием расходных реактивов, предназначенных для метода ПЦР «Real time».

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: морская медицина, коронавирусная инфекция, полимеразная цепная реакция, лабораторная диагностика, ПЦР «конечная точка»

*Для корреспонденции: Пищугин Дмитрий Юрьевич, e-mail: 97583421@mail.ru

*For correspondence: Dmitriy Yu. Pishchugin, e-mail: 97583421@mail.ru

Для цитирования: Пищугин Д.Ю., Тарумов Р.А., Шубенкин С.Г., Шеменева А.Н., Цинцадзе О.Г., Охотская Л.Л. Возможность применения технологии «конечная точка» для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в полевых условиях: проспективное исследование // *Морская медицина*. 2022. Т. 8, № 3. С. 100–104, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2022-8-3-100-104>.

For citation: Pishchugin D.Yu., Tarumov R.A., Shubenkin S.G., Shemeneva A.N., O.G. Tsintsadze, Ohotskaya L.L. Possibility of applying the end point technology for detecting SARS-CoV-2 virus RNA in the field conditions // *Marine medicine*. 2022. Vol. 8, No. 3. P. 100–104, doi: <http://dx.doi.org/10.22328/2413-5747-2022-8-3-100-104>.

© Авторы, 2022. Издательство ООО «Балтийский медицинский образовательный центр». Данная статья распространяется на условиях «открытого доступа», в соответствии с лицензией CC BY-NC-SA 4.0 («Attribution-NonCommercial-ShareAlike» / «Атрибуция-Некоммерчески-Сохранение Условий» 4.0), которая разрешает неограниченное некоммерческое использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии указания автора и источника. Чтобы ознакомиться с полными условиями данной лицензии на русском языке, посетите сайт: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.ru>

POTENTIAL BENEFITS OF IMPLEMENTING THE TECHNOLOGY «ENDPOINT» TO DETECT RNA VIRUS SARS-CoV-2 IN FIELD CONDITIONS: PROSPECTIVE STUDY

¹Dmitriy Yu. Pishchugin[✉]*, ²Roman A. Tarumov[✉], ¹Sergey G. Shubenkin[✉],

¹Anna N. Shemeneva[✉], ¹Otari G. Tsintsadze[✉], ¹Lyudmila L. Ohotskaya[✉]

¹637 center for state sanitary and epidemiological surveillance, Sevastopol, Russia

²State Scientific-research Test Institute of the Military Medicine, St. Petersburg, Russia

OBJECTIVE: the assessment of potential benefits of implementing hardware technologies, available for supply in the Russian Armed Forces to hold mass rapid screening test of servicemen for RNA virus SARS-CoV-2 by PCR on «endpoint» in field conditions.

MATERIALS AND METHODS: PCR on «endpoint» was applied according to the protocol of RNA virus detection by the set of test system PCR-RV «PolivirSARS-CoV-2» with extraction reagent «RNA-express», joint production of LLC NPF «Litech» and the Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine FMBA. The bio-material for the research was 157 samples of nasal-pharyngeal smears, taken from patients with clinical symptoms of respiratory disease who had contacts with COVID-19.

Statistics. The data received from pilot studies had standard statistical processing in the program «Statistica 6,0». Non-parametric Pearson's chi-square (χ^2) criteria was used to assess the significance of different observation frequencies of the studied feature in independent groups. Probability $p \leq 0,05$ and higher was considered sufficient to conclude statistical importance of the differences received.

RESULTS: It is stated that out of 157 biomaterial samples, assessed for the content of SARS-CoV-2 virus's genetic markers by PCR on «endpoint» and PCR «Realtime», 141 and 146 samples, respectively, turned out to be positive. In addition, there were no statistically important differences between the received data in these methods ($\chi^2=1,013$, $p=0,31$).

DISCUSSION: It is shown that comparative characteristics of the studied methods in laboratory SARS-Cov-2 virus diagnostics suggested the possibility of detecting specific segment of the virus genome by PCR «endpoint» technology, using expendable reagents, made for PCR «Realtime».

KEYWORDS: marine medicine, coronavirus infection, polymerase chain reaction, laboratory diagnosis, PCR «endpoint»

Введение. Нестихающие темпы распространения пандемии COVID-19 по всему миру диктуют необходимость разработки и внедрения технологий, посредством которых в кратчайшие сроки и без потери чувствительности и специфичности можно проводить этиологическую диагностику новой коронавирусной инфекции [1, с. 182]. В этом смысле даже лабораториям с высокой производительностью требуется как минимум 3–4 ч от отбора проб до получения результата, а окончательная информация о наличии вируса у пациента может занять и до одних суток. Это обстоятельство препятствует широкому тестированию всех потенциальных контактных лиц и несет в себе риск дальнейшего распространения вируса SARS-CoV-2 среди населения. Вместе с тем имеются сведения о существовании подходов к выявлению вирусной РНК

путем применения экспресс-технологии Point-of-care testing¹. Аппаратные решения такой технологии обычно разрабатываются для того, чтобы пользователи даже без профессиональной переподготовки могли легко их применять, а результат получать уже через 25–40 мин после забора биоматериала. Такие решения технически не сложны и могут идеально использоваться потребителями как в домашних, так и в полевых условиях, что крайне важно, в том числе и для Вооруженных сил.

К сожалению, на снабжении в госпиталях, медицинских отрядах специального назначения и центрах государственного санитарно-эпидемиологического надзора (ЦГСЭН) Минобороны России таких экспресс-технологий пока нет. Единственным средством, которым может располагать военный врач-бактериолог ЦГСЭН, или начальник отделения (лабораторного)

¹ <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019-covid-19-pandemic> (дата обращения: 11.12.2021).

госпитального звена Вооруженных сил, работая в полевых условиях в очаге и проводя таким образом этиологическую диагностику бактериальной или вирусной инфекции, является мобильная ПЦР-лаборатория МПЛ-1 (ДНК-Технология, Россия), в состав которой входит амплификатор «Терцик» и двухканальный флуориметр «Джин». Такой комплекс направлен на проведение ПЦР-диагностики многих заболеваний, но только лишь по технологии «конечная точка». Это является своеобразным ограничением для идентификации вируса SARS-CoV-2, так как к настоящему времени все тест-системы для диагностики такового работают по технологии ПЦР «Real time» или изотермальной петлевой амплификации¹ [2, с. 24–54].

Учитывая данное обстоятельство, мы предлагаем максимально использовать имеющиеся отечественные разработки и адаптировать работу МПЛ-1 для тест-систем ПЦР «Real time» в рамках этиологической диагностики вируса SARS-CoV-2 в полевых условиях.

Цель. Оценить возможность применения технологии «конечная точка» для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в полевых условиях.

Материалы и методы. Проведена оценка возможности применения технологии ПЦР по «конечной точке» по протоколу выявления РНК вируса комплектом тест-системы ПЦР-РВ «Поливи́р SARS-CoV-2» с реагентом выделения «РНК-экспресс» совместного производства ООО НПФ «Литех» и Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА. Биоматериалом для исследования явились 157 образцов назофарингеальных мазков, отобранных у лиц с клинической симптоматикой респираторного заболевания и контактных по COVID-19. Образцы до проведения исследования содержали в транспортной среде при -28°C . После выделения РНК вируса из аликвот была выполнена амплификация с детекцией на приборе RotorGene-Q («QJAGEN», Германия) и параллельно на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) с последующим анализом на флуориметре «Джин» («ДНК-технология», Россия). Постановку проб на приборе «Терцик» осуществили по температурно-временным параметрам

и настройкам, описанным в инструкции к набору реагентов «Поливи́р SARS-CoV-2»².

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные подвергали стандартной статистической обработке в программе «Statistica 6,0». Для оценки значимости различия частот наблюдения изучаемого признака в независимых группах использовали непараметрический критерий Пирсона хи-квадрат (χ^2) [3, с. 52]. Вероятность $p \leq 0,05$ и выше считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

Результаты. Установлено, что после детекции генетического материала вируса по технологии ПЦР «Real time» на приборе RotorGene-Q, из представленных образцов экспериментальной панели 146 оказались положительными и 11 — отрицательными по содержанию РНК вируса. При этом отмечался хороший сигнал внутреннего контроля, что соответствует заданным параметрам.

В то же время те экспериментальные образцы панели ПЦР «конечная точка», сигналы которых по каналу FAM были соизмеримы с положительным контролем, нами приняты как положительные по содержанию вируса. Такие сигналы в условиях исследования были идентифицированы из 141 пробы, что составляет 96,6% данных, полученных при детекции тех же образцов, только по технологии ПЦР «Real time». При этом статистически значимых различий между данными, полученными в ходе лабораторной диагностики COVID-19 изучаемыми методами, обнаружено не было ($\chi^2=1,013$, $p=0,31$), что является убедительным признаком хорошей воспроизводимости.

Обсуждение. Таким образом, сравнительное изучение двух принципиально разных подходов к обнаружению РНК вируса SARS-CoV-2, на наш взгляд, определило возможность детекции специфического участка генома SARS-CoV-2 по технологии ПЦР «конечная точка» с использованием реактивов и материалов, предназначенных для работы по методике ПЦР «Real time».

Между тем результаты, полученные в ходе исследования образцов по технологии ПЦР «конечная точка», в настоящем исследовании

¹ <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations> (дата обращения: 11.12.2021).

² <http://www.lytech.ru/product/infektsionnye-vozbuditeli-cheloveka/koronavirusnaya-infektsiya/coronavirus-express> (дата обращения: 11.12.2021).

оказались сложно интерпретируемыми, поскольку флуориметр «Джин» не имеет третьего канала для выявления сигнала внутреннего контроля Су5. Однако при оценке достоверности эффективности амплификации ПЦР-смеси нам пришлось признать наличие таковой исходя из высокого сигнала положительного контроля канала FAM. Именно сигнал флуоресцентного красителя FAM, который указывает на наличие специфического участка генома вируса SARS-CoV-2, стал определяющим маркером оценки технологии ПЦР «конечная точка» в эксперименте. Сигналы по ка-

налу HEX не представляли информационной ценности, так как существенно не отличались по величине в контрольных образцах протекания реакции ПЦР и образцах экспериментальной панели, а также в фоне.

Заключение. Полученные данные мы считаем перспективными для дальнейшей разработки и применения отечественных технологий ПЦР «конечная точка» и, особенно, быстрого неконтаминационного метода выделения РНК вируса SARS-CoV-2 реагентом «РНК-экспресс» при массовом обследовании военнослужащих в нестационарных полевых условиях.

Сведения об авторах:

Пищугин Дмитрий Юрьевич — начальник федерального государственного казенного учреждения «637 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Министерства обороны Российской Федерации; главный государственный санитарный врач; 299028, Севастополь, ул. Древняя, д. 40; e-mail: 97583421@mail.ru;

Тарумов Роман Алексеевич — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник 13 отдела федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации; 195043, Санкт-Петербург, Лесопарковая ул., д. 4; e-mail: tarumov_ra@mail.ru;

Шубенкин Сергей Геннадиевич — начальник отдела (микробиологического) федерального государственного казенного учреждения «637 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Министерства обороны Российской Федерации; 299028, Севастополь, ул. Древняя, д. 40; e-mail: 97583421@mail.ru;

Шеменева Анна Николаевна — старший врач-эксперт отдела (государственного санитарно-эпидемиологического надзора района ответственности) федерального государственного казенного учреждения «637 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Министерства обороны Российской Федерации; 299028, Севастополь, ул. Древняя, д. 40; e-mail: 97583421@mail.ru;

Цинцадзе Отари Григорьевич — кандидат медицинских наук, заведующий отделением особо опасных инфекций отдела (микробиологического) федерального государственного казенного учреждения «637 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Министерства обороны Российской Федерации; заслуженный врач РФ, член-корреспондент Академии медико-технических наук РФ; 299028, Севастополь, ул. Древняя, д. 40; e-mail: 97583421@mail.ru;

Охотская Людмила Леонидовна — врач-бактериолог отдела (микробиологического) федерального государственного казенного учреждения «637 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Министерства обороны Российской Федерации; 299028, Севастополь, ул. Древняя, д. 40; e-mail: 97583421@mail.ru.

Information about the authors:

Dmitry Yu. Pishchugin — Head of the 637 Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision — Chief State Sanitary Doctor; 299028, Sevastopol, 40 Drevnaya str., Russia; e-mail: 97583421@mail.ru;

Roman A. Tarumov — Senior Researcher, Department 13, Research Testing Research Testing Center (Applied Research and Field Testing), Candidate of Medical Sciences; 195043, St. Petersburg, st. Lesoparkovaya 4, Russia; e-mail: tarumov_ra@mail.ru;

Sergey G. Shubenkin — Head of the Department (Microbiological) 637 of the Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision; 299028, Sevastopol, 40 Drevnaya str., Russia; e-mail: 97583421@mail.ru;

Anna N. Shemeneva — Senior medical expert of the Department (State Sanitary and Epidemiological supervision of the area of responsibility) 637 of the Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision; 299028, Sevastopol, 40 Drevnaya str., Russia; e-mail: 97583421@mail.ru;

Otari G. Tsintsadze — Cand. of Sci. (Med.), Head of the Department of Especially Dangerous Infections of the Department (Microbiological) 637 of the Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision, Honored Doctor of the Russian Federation, Corresponding Member of the AMTN of the Russian Federation; 299028, Sevastopol, 40 Drevnaya str., Russia; e-mail: 97583421@mail.ru;

Ljudmila L. Okhotskaya — bacteriologist of the Department (Microbiological) 637 of the Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance, 299028, Sevastopol, 40 Drevnaya str., Russia; e-mail: 97583421@mail.ru.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства, согласно международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Наибольший вклад распределен следующим образом. Вклад в концепцию и план исследования — Д. Ю. Пиццугин, С. Г. Шубенкин. Вклад в сбор данных — А. Н. Шеменова, О. Г. Цинцадзе, Л. Л. Охотская. Вклад в анализ и выводы — Р. А. Тарумов. Вклад в подготовку рукописи — Р. А. Тарумов.

Author contribution. All authors according to the ICMJE criteria participated in the development of the concept of the article, obtaining and analyzing factual data, writing and editing the text of the article, checking and approving the text of the article. The largest contribution is distributed as follows. *DYuP, SGSh contribution to the concept and plan of the study. ANSh, OGC, LLO contribution to data collection. PAT contribution to data analysis and conclusions. PAT contribution to the preparation of the manuscript.*

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare that they have no competing interests.

Благодарность. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук Копылову В.М. за методическую помощь в подготовке публикации.

Acknowledgments. The authors would like to thank V. M. Kopylov (Cand. of Sci. (Biol.)) for his methodical assistance in the preparation of the publication.

Поступила/Received: 19.01.2022

Принята к печати/Accepted: 02.09.2022

Опубликована/Published: 30.09.2022

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Döhla M., Boesecke C., B Schulte, Diegmann C., Sib E., Richter E., Eschbach-Bludau M., S Aldabbagh, Marx B., Eis-Hübinger A-M., Schmithausen R.M., Streeck H. Rapid point-of-care testing for SARS-CoV-2 in a community screening setting shows low sensitivity // *Public health*. 2020. Vol. 182. P. 170–172. doi: 10.1016/j.puhe.2020.04.009.
2. Ravi N. Cortade D., Ng E., Wang Sh. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape // *Biosensors and bioelectronics*. 2020. Vol. 165. P. 24–54. doi: 10.1016/j.bios.2020.112454.
3. Платонов А.Е. *Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы*. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с. Platonov A.E. *Statisticheskij analiz v medicine i biologii: zadachi, terminologiya, logika, komp'yuternye metody*. М.: Izd-vo RAMN, 2000. 52 s. [Platonov A.E. *Statistical analysis in medicine and biology: tasks, terminology, logic, computer methods*. Moscow: Publishing house of the Russian Academy of Medical Sciences, 2000. 52 p. (In Russ.)].